

**Funktionelle Charakterisierung von Mitgliedern  
einer Süßgras-spezifischen Familie von Kationentransportern aus  
Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von Herrn Dipl.-Biol.

Ricardo Happeck  
geb. am 01.01.1981 in Prenzlau

Halle (Saale), 05.11.2018



Gutachter:

1. Prof. Dr. Edgar Peiter
2. Prof. Dr. Gabriel Schaaf



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Salzstress .....	1
1.1.1. Natriumaufnahme in Wurzeln und Natriumtranslokation in den Spross .....	1
1.1.2. Mechanismen der Salztoleranz .....	2
1.2. Die Rolle von Calcium in der Pflanze .....	3
1.2.1. Generierung von Calciumsignalen.....	3
1.2.2. Calciumsignalperzeption .....	6
1.3. Low-affinity Cation Transporter (LCT) .....	7
1.3.1. TaLCT1 .....	8
1.3.2. OsLCT1.....	9
1.4. Auxin .....	10
1.4.1. Auxinsynthese und -speicherung.....	11
1.4.2. Auxintransport .....	11
1.4.2.1. PIN-Transporter .....	12
1.4.2.2. PINs in Süßgräsern.....	14
1.4.3. Auxinperzeption und Auxin-regulierte Genexpression .....	15
1.5. Ziel der Arbeit .....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1. Materialien .....	18
2.1.1. Chemikalien .....	18
2.1.2. Antibiotika und Herbizide.....	21
2.1.3. Enzyme .....	22
2.1.4. Kulturmedien .....	23
2.1.5. Plasmidvektoren.....	26
2.1.6. Oligonukleotide.....	30
2.1.7. Bakterien .....	32
2.1.8. Hefen ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	32
2.1.9. Pflanzen .....	33
2.1.10. Software & Datenbanken.....	34
2.2. Methoden.....	35
2.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	35
2.2.1.1. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial.....	35
2.2.1.2. RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial.....	35
2.2.1.3. cDNA-Synthese .....	35
2.2.1.4. Isolierung genomischer DNA aus Hefe .....	36
2.2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36

2.2.1.6. Semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR (sqRT-PCR).....	37
2.2.1.7. Sequenzierung.....	38
2.2.1.8. TA-Klonierung.....	39
2.2.1.9. Klonierung.....	40
2.2.1.10. Herstellung kompetenter Bakterien .....	47
2.2.1.11. Bakterientransformation .....	47
2.2.1.12. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	47
2.2.2. Transformationsmethoden.....	48
2.2.2.1. Hefe-Transformation .....	48
2.2.2.2. Tabak-Blattinfiltration.....	48
2.2.2.3. Protoplastentransformation (Gerste & Weizen) .....	49
2.2.2.4. Gerste-Transformation .....	51
2.2.2.5. Arabidopsis-Transformation .....	53
2.2.3. Heferversuche .....	53
2.2.3.1. Wachstumsversuche ( <i>Drop-Assays</i> ) .....	53
2.2.3.2. Calciummessungen in Hefe .....	54
2.2.3.3. Messung des cytosolischen pH-Werts in Hefe .....	55
2.2.4. Pflanzenversuche.....	57
2.2.4.1. Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Agarplatten.....	57
2.2.4.2. Quantifizierung des Wurzelgravitropismus .....	57
2.2.4.3. Nachweis von Auxin-Effekten in <i>DR5::GUS</i> -Pflanzen .....	58
2.2.4.4. Statistische Auswertung.....	59
2.2.5. Färbemethoden & Mikroskopie.....	59
2.2.5.1. Histochemische GUS-Färbung.....	59
2.2.5.2. Färbung von Statolithenstärke mit Lugol'scher Lösung .....	60
2.2.5.3. FM4-64- und Propidiumiodid-Färbung von Wurzelzellen .....	60
2.2.5.4. FM4-64 Färbung in Hefezellen.....	61
2.2.5.5. Mikroskopie.....	61
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
3.1. Konstitutive Expression von <i>TaLCT1</i> in Pflanzen und pflanzlichen Geweben ..	62
3.2. Phänotypen <i>TaLCT1</i> -exprimierender <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen.....	63
3.3. Phänotypen schwach <i>TaLCT1</i> -exprimierender <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen. 66	
3.3.1. Frühe Keimlingsentwicklung.....	66
3.3.2. Weiteres Keimlingswachstum.....	68
3.3.2.1. Wurzelwachstumsraten und Frischmassen .....	68
3.3.2.2. Wachstumsdefekte in Abhängigkeit vom Kulturmedium .....	70
3.3.2.3. Quantifizierung gravitropischen Wurzelwachstums .....	73

3.3.3. Mikroskopische Analysen der Wurzeln <i>TaLCT1</i> -exprimierender Pflanzen ..	74
3.4. Auxinhomöostase in <i>TaLCT1</i> -exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen .....	75
3.5. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 .....	78
3.5.1. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	78
3.5.2. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Weizen-Protoplasten .....	81
3.5.3. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Tabakzellen .....	82
3.5.4. Veränderungen der subzellulären Lokalisation .....	83
3.6. Verteilung und Lokalisation von Auxin-Effluxtransportern in <i>TaLCT1</i> - exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen .....	86
3.6.1. Untersuchung der PIN-Lokalisation während der frühen Keimlingsentwicklung .....	88
3.7. <i>In silico</i> -Analyse der putativen <i>TaLCT1</i> -Promotorregion aus Weizen .....	90
3.8. Heterologe Expression von <i>TaLCT1</i> in Hefe .....	91
3.8.1. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Hefezellen .....	91
3.8.2. Kolokalisationsanalysen von TaLCT1 in Hefezellen .....	92
3.8.3. Versuche mit FM4-64 in Hefezellen .....	93
3.8.4. Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) in <i>TaLCT1</i> - transformierten Hefezellen .....	95
3.8.5. Messungen des cytosolischen pH-Werts ( $pH_{cyt}$ ) in <i>TaLCT1</i> -transformierten Hefezellen .....	97
3.9. Identifizierung und initiale funktionelle Charakterisierung eines Mitglieds der <i>LCT</i> -Genfamilie aus Gerste .....	98
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>102</b>
4.1. Heterologe Expression von <i>TaLCT1</i> in Hefe .....	102
4.1.1. Subzelluläre Lokalisation .....	102
4.1.2. Effekte von TaLCT1 in Hefen, die auf Störungen des Vesikel- und Membrantransports deuten .....	104
4.1.3. Mögliche Erklärungen für die veränderte Kationenhomöostase in <i>TaLCT1</i> - exprimierenden Hefezellen .....	105
4.1.4. Alternative Erklärungen für die Phänotypen <i>TaLCT1</i> -exprimierender Hefen .....	110
4.2. TaLCT1 in Pflanzen .....	111
4.2.1. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Pflanzen .....	111
4.2.2. Mögliche Ursachen für die Auxin-Phänotypen <i>TaLCT1</i> -exprimierender Arabidopsis-Pflanzen .....	113
4.3. Parallelen zwischen <i>TaLCT1</i> -exprimierenden Pflanzen und Hefen .....	115
4.4. Mögliche Wirkmechanismen von TaLCT1 .....	117

4.4.1. Veränderungen intrazellulärer pH-Werte durch TaLCT1 .....	117
4.4.2. Beeinflussung der Calciumhomöostase durch TaLCT1 .....	120
4.5. Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den Effekten von TaLCT1 und HvLCT2 .....	128
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>130</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>132</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>134</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>162</b>
8.1. Work flow for performing an analysis of root gravitropism .....	166
8.1.1. Step 1. Digitizing plants. ....	166
8.1.2. Step 2. Determination of growth coordinates with <i>ImageJ</i> .....	166
8.1.3. Step 3. Data processing in <i>GravProtractor</i> .....	168
8.1.3.1. 'Calculate' section .....	168
8.1.3.2. 'Draw' section.....	170
<b>9. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>172</b>
<b>10. Publikationen, Konferenzbeiträge, Posterpräsentationen.....</b>	<b>174</b>
<b>11. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>176</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>177</b>
<b>13. Curriculum Vitae.....</b>	<b>179</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Salzstress

Versalzte Böden senken die Wachstumsraten von Pflanzen und stellen somit einen ernst zu nehmenden limitierenden Faktor für die Nutzpflanzenproduktion dar. Mittlerweile sind nach Schätzungen etwa 6% der Gesamtfläche und circa 20% der bewässerten landwirtschaftlich genutzten Fläche weltweit von Versalzung betroffen (Munns & Tester, 2008; F.A.O., 2016). Nach heutigen Erkenntnissen kann der durch Salz (primär NaCl) ausgelöste Stress in Pflanzen in zwei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase wird durch den osmotischen Stress verursacht, den die Pflanze unmittelbar durch den Kontakt mit dem versalzten Medium erfährt und die als direkt sichtbaren Effekt eine Reduktion des Sprosswachstums zur Folge hat. Ionischer Stress bildet die zweite, zeitlich zur ersten verzögerte Phase des Salzstress. Sie führt zu vorzeitiger Blattseneszenz und wird durch die verstärkte Akkumulation von Natrium- und Chloridionen im Spross hervorgerufen (Munns & Tester, 2008). Hohe Natriumkonzentrationen im Cytosol, insbesondere bei niedrigem  $K^+/Na^+$  Verhältnis bilden hierbei das Hauptproblem. Die Toxizität der Natriumionen beruht im Wesentlichen auf der Inhibierung von kaliumabhängigen Enzymen, wie z.B. der Pyruvat-kinase, deren Aktivität durch Bindung von  $Na^+$  stark vermindert wird (Maathuis, 2009; Maathuis *et al.*, 2014).

Die Toleranz gegenüber Salzstress variiert stark zwischen verschiedenen Pflanzenarten aber auch innerhalb einzelner Arten. Der Transport von Natriumionen bildet hierbei eine wichtige Teilkomponente des Toleranzmechanismus gegenüber Salzstress und ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen ist deshalb wichtig für die Generierung toleranterer Pflanzen. Dies wiederum könnte zur Erhöhung der Ernteerträge von Nutzpflanzen unter diesen schwierigen Wachstumsbedingungen führen.

### 1.1.1. Natriumaufnahme in Wurzeln und Natriumtranslokation in den Spross

Bereits frühe Studien deuteten darauf hin, dass die Natriumaufnahme in Pflanzenwurzeln über Influxsysteme mit unterschiedlichen Kinetiken stattfindet: ein saturierbares hoch-affines Transportsystem und ein nicht saturierbares niedrig-affines Transportsystem (Epstein, 1966; Plett & Moller, 2009). Zwar bilden nach heutigen Erkenntnissen Transporter und Ionenkanäle den Haupteintrittsweg für Natrium in Pflanzenzellen, allerdings konnten hierfür bisher nur relativ wenige mögliche Gene direkt identifiziert und charakterisiert werden (Deinlein *et al.*, 2014). Zu den wahrscheinlichsten Kandidaten gehören die nicht-selektiven, Liganden-aktivierten und

Calcium-permeablen Cyclic Nucleotide-Gated Channels (CNGCs; Kaplan *et al.*, 2007), Glutamate-Like Receptors (GLRs; Davenport, 2002) und andere, bisher nicht identifizierte oder näher untersuchte Non-Selective Cation Channels (NSCCs; Demidchik & Maathuis, 2007). Daneben konnte auch für OsHKT2;1, einem Vertreter der hoch-affinen Kaliumtransporter (HKT), Natriumimportaktivität in Reisswurzeln unter Kaliummangelbedingungen nachgewiesen werden (Horie *et al.*, 2007).

Die weitere Natriumtranslokation von der Wurzel in den Spross geschieht über die Be- und Entladung des Kations in das und aus dem Xylem. Neben CHX21, einem Mitglied der Cation Hydrogen Exchanger Familie (CHX; Hall *et al.*, 2006), scheinen auch hierbei wiederum verschiedene HKT-Transporter eine wesentliche Rolle zu spielen (Horie *et al.*, 2009). So konnte beispielsweise für den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Kotransporter HvHKT2;1 gezeigt werden, dass dessen Überexpression in Gerste zu einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Translokation von der Wurzel in den Spross und damit zu verbesserter Salztoleranz führt (Mian *et al.*, 2011). Zusätzlich zu diesem aktiven Transport sind möglicherweise auch passive, zur Gruppe der KOR-Kanäle (K<sup>+</sup> outward rectifier) gehörende Transportsysteme an der Natriumbeladung des Xylems beteiligt (De Boer & Wegner, 1997; Wegner & De Boer, 1997; Gaymard *et al.*, 1998; Deinlein *et al.*, 2014).

Basierend auf Ergebnissen heterologer Expressionsversuche in Hefen wurde auch die Familie der Low-affinity Cation Transporter (LCT) als möglicher Influxweg für Natrium in Pflanzen diskutiert (Schachtman *et al.*, 1997; Amtmann *et al.*, 2001). Da das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit auf dieser Genfamilie liegt, wird sie in Kapitel 1.3 im Detail betrachtet und an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

## 1.1.2. Mechanismen der Salztoleranz

Untersuchungen an Arabidopsis-Wurzeln zeigten eine differentielle Expression von über 5500 Genen infolge von Salzstress (Geng *et al.*, 2013). Darunter befinden sich Vertreter der bZIP- (Basic Leucine Zipper), bHLH- (Basic Helix-Loop-Helix), AP2/ERF- (APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR), NAC-, MYB- und WRKY-Transkriptionsfaktoren (Golldack *et al.*, 2011). Diese selbst wiederum regulieren die Expression verschiedener Gene, die die eigentliche Stressantwort ausmachen. Um beispielsweise der durch die osmotische Komponente verursachten Verringerung des Turgordrucks in Zellen und der dadurch verursachten Inhibierung der Zellelongation entgegenzuwirken, werden Gene für die Aufnahme anorganischer Ionen sowie der Synthese protektiver organischer Osmolyte wie Prolin oder Betain exprimiert (Munns & Tester, 2008). Als eine Reaktion auf die ionische Komponente des Salzstresses dagegen werden zum einen Gene für Plasmamembran-lokalisierte Transporter (z.B. NHX7/SOS1), die Natrium in den Apoplasten exportieren und zum anderen Gene für Tonoplasten-lokalisierte Transporter (z.B. NHX1 und NHX2), die toxische Ionen in Vakuolen sequestrieren, verstärkt exprimiert (Apse *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2000).

Die Transkription vieler Salzstress-induzierter Gene wird zusätzlich von einem Signalnetzwerk verschiedener Phytohormone wie Jasmonat, Gibberellinsäure, Brassinosteroide oder Abscisinsäure beeinflusst (Geng *et al.*, 2013; Deinlein *et al.*, 2014). Während beispielsweise NHX7 spezifisch nur durch Natriumchlorid induziert wird, konnte für einige der vakuolären NHX-Transporter in Arabidopsis gezeigt werden, dass deren Expression auch durch Zugabe von Abscisinsäure induziert werden kann (Shi *et al.*, 2000; Yokoi *et al.*, 2002).

Neben den Phytohormonen ist auch Calcium als essentieller intrazellulärer Botenstoff, der unter anderem bei der Anpassung an Salzstress eine wichtige Rolle spielt, beschrieben. Da darüberhinaus auch das in dieser Arbeit näher untersuchte TaLCT1-Protein als möglicher zellulärer Influxweg für Calciumionen vorgeschlagen wurde (Clemens *et al.*, 1998; siehe auch Kapitel 1.3), soll die Rolle des Calciums in Pflanzen im folgenden Kapitel genauer betrachtet werden.

## 1.2. Die Rolle von Calcium in der Pflanze

Das bivalente Kation Calcium ist essentiell für die Strukturgebung von Pflanzen, z.B. durch Vernetzung Pektin-assoziiertes Carboxylgruppen in Zellwänden oder negativ geladener Gruppen der Phospholipide in Zellmembranen (Maathuis, 2009). Obwohl das Element somit einen wichtigen Makronährstoff darstellt, wirken hohe Calciumkonzentrationen im Cytosol der Zellen eher toxisch. Die Ursache hierfür ist zum einen, dass Calcium zusammen mit Sulfaten und Phosphaten unlösliche und somit zellschädigende Salze bilden würde. Zum anderen ist Calcium in der Funktion eines sekundären Botenstoffs (*Second Messenger*) an der Signaltransduktion vieler zellulärer Prozesse wie z.B. der Verarbeitung von ionischem und osmotischem Stress beteiligt (Knight *et al.*, 1997). Aus diesen Gründen wird die Konzentration freien Calciums im Cytosol üblicherweise im nanomolaren Bereich gehalten.

### 1.2.1. Generierung von Calciumsignalen

Calcium-permeable Kanäle, die Ionen passiv, d.h. entlang bestehender elektrochemischer Gradienten transportieren, nehmen bei der Generierung von Calciumsignalen eine Schlüsselrolle ein. Ionenströme, die auf solche Kanäle schließen lassen, konnten an zahlreichen pflanzlichen Membranen, wie z.B. Plasmalemma, ER oder Tonoplast gemessen werden. Die genaue genetische Identität dieser Kanalproteine ist allerdings oftmals ungeklärt. So konnte beispielsweise in früheren Studien gezeigt werden, dass die Botenstoffe cADPR (cyclische ADP Ribose) und IP<sub>3</sub> (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) sowohl an Tonoplasten- als auch ER-Membranen zur Calciumfreisetzung führen (Allen *et al.*, 1995; Muir & Sanders, 1997; Navazio *et al.*, 2001). In tierischen Zellen vermitteln cADPR-sensitive Ryanodinrezeptoren und IP<sub>3</sub>-

sensitive Kanäle ähnliche Calciumfreisetzungen. Proteine, die eine Sequenzhomologie zu den tierischen Ryanodinrezeptoren oder IP<sub>3</sub>-aktivierbaren Ca<sup>2+</sup>-Kanälen aufweisen, konnten in Pflanzen allerdings nicht identifiziert werden (Peiter, 2011).

Im Allgemeinen deuten zahlreiche Studien über den Einstrom von Calcium in das Cytosol auf eine wichtige Rolle nicht-selektiver, Calcium-permeabler Kationenkanäle (NSCC). So zeigen elektrophysiologische Untersuchungen die Anwesenheit spannungsabhängiger Kanäle in Plasmalemma und Endomembranen an, welche in depolarisationsaktivierte (DACCs) und hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle (HACCs) eingeteilt werden können (White & Broadley, 2003). Neben den spannungsabhängigen Kanälen sind auch die bereits erwähnten Ligand-aktivierten, spannungsinsensitiven GLRs und CNGCs bei der Generierung von Calciumsignalen involviert (Davenport, 2002; Kaplan *et al.*, 2007; Demidchik & Maathuis, 2007; Dodd *et al.*, 2010). So konnte für einzelne Vertreter beider Gruppen eine Beteiligung bei der Entstehung von Ca<sup>2+</sup>-Signalen u.a. bei gravitropischen Wachstumsreaktionen, beim Pollenschlauchwachstum oder bei der Pathogenabwehr aufgezeigt werden (Miller *et al.*, 2010; Michard *et al.*, 2011; Chin *et al.*, 2013; Manzoor *et al.*, 2013; Shih *et al.*, 2015; Charpentier *et al.*, 2016; DeFalco *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016). Während die GLRs in Pflanzen scheinbar ausschließlich in der Plasmamembran zu finden sind, konnten einzelne Vertreter der CNGCs neben dem Plasmalemma auch in Vakuolen, Kernmembranen, ER und Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Christopher *et al.*, 2007; Yuen & Christopher, 2013; Charpentier *et al.*, 2016).

Mit den Annexinen sind in den letzten Jahren eine weitere Familie Calcium-permeabler Proteine verstärkt in den Fokus der Forschung geraten (Dodd *et al.*, 2010). Annexine sind multifunktionale, Lipid-bindende Proteine, die sowohl gelöst im Cytosol als auch in nahezu allen pflanzlichen Membranen zu finden sind. Ihre subzelluläre Lokalisation und Assoziation mit Membranen scheint hierbei stark reguliert durch Faktoren wie z.B. Ca<sup>2+</sup>, pH, Lipide, Spannung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder die Interaktion mit anderen Proteinen. So divers wie ihre Lokalisation sowie die diese beeinflussenden Faktoren, erscheint auch die biologische Funktion der Annexine. Hier sind Mitwirkung an Membrantransport (Exo- / Endocytose) und -reparatur, Kohlehydratsynthese, Cytoskelettdynamik, ROS-Regulation und Ionentransport beschrieben (Laohavisit & Davies, 2011). Kürzlich konnte für das Plasmamembran-assoziierte AtANN1 (Annexin 1 aus *A. thaliana*) eine Beteiligung an der Entstehung NaCl-induzierter und ROS-regulierter Calciumsignale in Arabidopsis-Wurzelprotoplasten gezeigt werden (Laohavisit *et al.*, 2013).

Auch die bereits erwähnten Low-affinity Cation Transporter (LCTs) wurden als mögliche Monokotyledonen-spezifische Influxwege für zelluläres Calcium beschrieben (Clemens *et al.*, 1998). Auf sie wird in Kapitel 1.3 näher eingegangen.

Niedrige cytosolische Calciumkonzentrationen (50 bis 150 nM im ungestressten Zustand) werden hauptsächlich durch die Aktivität ATP-getriebener Ca<sup>2+</sup>-Pumpen und

## Einleitung

---

Transporter der  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Exchanger-Familie (CAX) gehalten, die Calciumionen entweder aus der Zelle oder in interne Kompartimente, wie z.B. Vakuole oder Endoplasmatisches Retikulum (ER) verlagern (Sze *et al.*, 2000). Sowohl verstärkter Calciuminflux als auch verminderter -efflux haben erhöhte Calciumkonzentrationen im Cytosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) zur Folge. Das zeitlich und räumlich variable Zusammenspiel von Efflux und Influx bewirkt wiederum, dass Zellen auf unterschiedlichste endo- und exogene Stimuli mit spezifischen sogenannten Calciumsignaturen reagieren (z.B. einzelne, schnell oder langsam ansteigende und abklingende Transienten, biphasische Signale oder Oszillationen). Unterschiedliche Calciumsignaturen können hierbei durch die Parameter Signallokalisation, Signaldauer, Signalstärke (Amplitude) und, im Fall von oszillierenden Signalen, der Frequenz beschrieben werden (White & Broadley, 2003).

Neben lokalen, Stress-induzierten Calciumsignalen wird seit einiger Zeit auch die biologische Rolle systemischer Calciumwellen in Pflanzen diskutiert (Gilroy *et al.*, 2014). So konnte an *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen gezeigt werden, dass die lokale Applikation von Natriumchloridlösung (aber nicht von Sorbitol als Osmotikum) an Wurzelspitzen ein Calciumsignal auslöst, welches sich durch die Wurzel in Richtung Spross mit einer Geschwindigkeit von ca. 400  $\mu\text{m/s}$  über den gesamten Keimling ausbreitet (Choi *et al.*, 2014). Als eine wichtige Teilkomponente dieser systemischen Calciumsignale ist der vakuoläre Calcium-permeable SV-Kanal (slowly activated vacuolar channel) beschrieben, der in *Arabidopsis* vom Gen *TPC1* (Two Pore Channel 1) kodiert wird (Peiter *et al.*, 2005). Obwohl lokale Calciumsignale infolge biotischen oder abiotischen Stresses in *tpc1 knockout*-Mutanten nicht signifikant verändert sind (Ranf *et al.*, 2008), ist die Fortpflanzungsgeschwindigkeit der NaCl-induzierten, systemischen Calciumwellen um das 25-fache reduziert. Des Weiteren ist eine veränderte Expression Salzstress-induzierter Markergene im Spross der Mutante zu beobachten (Choi *et al.*, 2014). Nichtsdestotrotz ist die physiologische Relevanz dieser Calciumwellen bisher ungewiss. So scheinen zwar *TPC1*-überexprimierende Pflanzen leicht resistenter gegenüber Salzstress zu sein, *tpc1 knockout*-Mutanten zeigen allerdings, trotz der drastisch verringerten Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Calciumwellen und der veränderten Markergenexpression, kein verändertes Wachstum auf salzhaltigen Nährmedien. Auch das detaillierte Zusammenspiel mit anderen systemischen Signalwegen (z.B. elektrisch oder hormonell) ist weitestgehend unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen (Gilroy *et al.*, 2014). Neuere mathematischen Modelle gestützt von Untersuchungen an *Arabidopsis-knockout*-Mutanten deuten allerdings, im Falle der NaCl-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, auf eine Interaktion mit apoplastischen Wellen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), deren Bildung von der Plasmamembran-lokalisierten NADPH-Oxidase RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homolog D) katalysiert wird (Evans *et al.*, 2016; Peiter, 2016).

## 1.2.2. Calciumsignalperzeption

Die weitere Verarbeitung von Calciumsignalen erfolgt mittels verschiedener Klassen von Sensorproteinen. Hierbei wird im Wesentlichen zwischen *Sensor-Responder*-Proteinen und *Sensor-Relay*-Proteinen unterschieden. Erstere, zu denen z.B. die Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CDPKs =  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinases) gehören, verfügen sowohl über  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domänen (z.B. EF-Hände oder C2-Domänen), die bei Aktivierung zu einer Konformationsänderung führen, als auch über eine weitere katalytische Effektor-domäne (z.B. Kinasedomäne), die wiederum durch die Konformationsänderung aktiviert wird. Somit sind in Proteinen dieser Gruppe die initiale Calciumperzeption als auch eine darauf folgende Antwortaktivität vereint (Sanders *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu besitzen *Sensor-Relay*-Proteine zwar ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domänen, die infolge ihrer Aktivierung wiederum Konformationsänderungen bewirken, katalytisch aktive Effektor-domänen wie bei den *Sensor-Responder*-Proteinen fehlen allerdings. Stattdessen treten diese Proteine nach Calciumbindung in direkte Interaktion mit Effektorproteinen, die durch die Bindung der Sensorproteine reguliert werden (Dodd *et al.*, 2010). Zur Gruppe der *Sensor-Relay*-Proteine gehören z.B. die Calmoduline (CaM), die, aktiviert nach Bindung von Calcium, mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten können (Bouché *et al.*, 2005). So werden z.B. bestimmte Transkriptionsfaktoren, die so genannten CAMTAs (CaM-binding transcription activators), durch  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM reguliert (Bouche *et al.*, 2002). Im Falle des AtCAM7 ist auch eine direkte Calcium-abhängige Interaktion mit *cis*-regulatorischen Promotorelementen einiger Licht-induzierter Gene im Zellkern beschrieben (Kushwaha *et al.*, 2008). Die Calmoduline und CAMTAs bilden somit eine direkte Verbindung zwischen Calciumsignalen und spezifischer Genexpression.

Eine weitere Gruppe von *Sensor-Relay*-Proteinen repräsentieren die CBLs (Calcineurin-B-Like Proteins), die ihrerseits ein hochkomplexes Interaktionsnetzwerk mit spezifischen Proteinkinasen, den CIPKs (CBL-interacting protein kinases) bilden. In Arabidopsis wurden über bioinformatische Analysen 10 CBLs und 26 CIPKs identifiziert, von denen zwischen vielen dieser Vertreter auch die direkte Interaktion bereits experimentell bestätigt werden konnte (Yu *et al.*, 2014). Physiologisch sind CBL-CIPK Interaktionen in Pflanzen an zahlreichen Stressreaktionen, wie z.B. Nährstoffmangel, Salz-, Trocken-, Kälte-, pH-, Verwundungsstress etc., beteiligt. Neben Abscisinsäure-assoziierten Stressreaktionen scheinen auch in den Signalwegen der Phytohormone Gibberellinsäure und Auxin CBLs und CIPKs involviert zu sein (Li *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011).

Einer der am besten untersuchten CBL-CIPK-regulierten Prozesse findet sich im so genannten Salt Overly Sensitive Pathway (SOS), dem eine entscheidende Rolle bei der Toleranz gegenüber Salzstress in Pflanzen zugeschrieben wird (Serrano & Rodriguez-Navarro, 2001). Die durch erhöhte Salzkonzentrationen ausgelöste



Gene vorhergesagt werden, tragen wiederum andere Mitglieder der Süßgrasfamilie, wie Mais (*Zea mays*) oder Zwenken (*Brachypodium sp.*), gar keine LCTs in ihrem Genom (Uraguchi *et al.*, 2014).

### 1.3.1. TaLCT1

Das als erstes identifizierte und näher charakterisierte Mitglied dieser Proteinfamilie, TaLCT1, wurde zunächst als möglicher zellulärer Influxweg für Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Ionen beschrieben, was wiederum zu der Hypothese führte, dass TaLCT1 eine Rolle bei der Salzsensitivität von Weizen spielen könnte (Blumwald *et al.*, 2000).

Das Gen wurde ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit, den Wachstumsdefekt eines Kaliumaufnahme-defizienten Hefestamms (*Saccharomyces cerevisiae* CY162) in Kulturmedien mit geringen Kaliumkonzentrationen zu komplementieren, aus einer aus Weizenwurzeln isolierten cDNA-Bank identifiziert. Die hierbei verwendete Hefemutante weist Deletionen in den Genen *TRK1* und *TRK2* auf, die den Hauptaufnahmeweg für Kaliumionen über die Plasmamembran in Hefezellen bilden (Gaber *et al.*, 1988; Ko & Gaber, 1991). Die Ergebnisse weiterer Transportexperimente mit Natrium und Rubidium, welches oft als *Tracer* für Kaliumionen Verwendung findet, untermauerten die Hypothese, dass es sich bei TaLCT1 um ein Transportprotein handelt, welches direkt den Einstrom bestimmter Kationen über die Plasmamembran der Hefezellen vermittelt (Schachtman *et al.*, 1997). In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Expression von *TaLCT1* in G19-Hefezellen, in denen die Gene der Na<sup>+</sup>-ATPasen ENA1 bis 4 deletiert sind, die Sensitivität dieser Zellen gegenüber Natrium- und Lithiumionen erhöht (Quintero *et al.*, 1996; Haro *et al.*, 1991; Amtmann *et al.*, 2001). Außerdem konnte ein Absinken des K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>-Verhältnisses in den Zellen beobachtet werden. Dies wird zum einen durch eine verstärkte Natriumakkumulation, zum anderen aber auch durch eine erhöhte Kaliumabgabe verursacht, was möglicherweise wiederum die Sensitivität der Zellen gegenüber Natrium und Lithium weiter erhöht, da Kalium durch die toxisch wirkenden Kationen verdrängt wird. Kalium wird hierbei möglicherweise durch den (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup>-Antiporter NHA1 (Bañuelos *et al.*, 1998) oder den auswärtsgerichteten, Membranpotential-regulierten Kaliumkanal TOK1 (Ketchum *et al.*, 1995; Bertl *et al.*, 1998; Fairman *et al.*, 1999) aus den Zellen verstärkt heraus transportiert (Amtmann *et al.*, 2001). Weiterhin war zu beobachten, dass die erhöhte Na<sup>+</sup>/Li<sup>+</sup>-Sensitivität der *TaLCT1*-exprimierenden Zellen, aber auch der Kontrollzellen, durch die Zugabe von KCl, CsCl oder CaCl<sub>2</sub> zum Medium abgemildert wird.

Neben der verstärkten Aufnahme monovalenter Kationen durch die Expression von *TaLCT1* konnte dies in weiteren Untersuchungen auch für einige bivalente Kationen, wie z.B. Calcium oder das toxische Schwermetall Cadmium gezeigt werden. *TaLCT1*-exprimierende Zellen von *S. cerevisiae* zeigten darüberhinaus Hypersensitivität gegenüber erhöhten Konzentrationen dieser Ionen (Clemens *et al.*, 1998). Zum Teil

gegensätzliche Ergebnisse zeigten sich bei der heterologen Expression von *TaLCT1* in der methylo trophen Hefe *Pichia pastoris*. Wurden in diesen Experimenten *TaLCT1*-exprimierende Zellen in Medium mit Cadmiumkonzentrationen von über 60  $\mu\text{M}$  inkubiert, kam es nicht zu einer erhöhten, sondern zu einer drastisch verminderten Cadmiumaufnahme um circa 80% im Vergleich zu Leervektor-transformierten Kontrollzellen (Diatloff *et al.*, 2006). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde berichtet, dass die Expression von *TaLCT1* in Tabak, reguliert über einen starken, konstitutiv aktiven 35S-Promoter, zu verbessertem Wachstum unter Cadmiumstress in Gegenwart von 1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  führt (Antosiewicz & Hennig, 2004). Zusätzlich zeigte sich unter diesen Bedingungen eine leicht verringerte Cadmiumakkumulation in den Wurzeln. Höhere  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Konzentrationen (3 mM) führten zur Aufhebung dieser Effekte und zu einem gleichermaßen verbesserten Wachstum von *TaLCT1*- und Leervektor-transformierten Kontrollpflanzen. In dieser, wie auch in anderen Studien, zeigte sich jedoch, dass die Abschwächung der Cadmiumtoxizität durch Calcium kein *TaLCT1*-spezifischer, sondern vielmehr ein allgemein in Pflanzen zu beobachtender Effekt ist (Skorzynska-Polit *et al.*, 1998; Suzuki, 2005; Li *et al.*, 2016). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass *TaLCT1* möglicherweise nicht selbst Cadmium transportiert, sondern vielmehr einen hemmenden Einfluss auf die endogenen Ionentransportsysteme der transformierten Pflanzen hat (Antosiewicz & Hennig, 2004).

In derselben Studie wurde ebenfalls berichtet, dass die Expression von *TaLCT1* in diesen Pflanzen in Gegenwart von niedrigen  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  Konzentrationen (0,01 mM) zu beschleunigtem Wurzelwachstum führt. In einer sich anschließenden Arbeit mit den gleichen transgenen Tabaklinien wurde allerdings gezeigt, dass dieses beschleunigte Wurzelwachstum scheinbar in keinem direkten Zusammenhang mit signifikant höherer Calciumakkumulation in Wurzel oder Spross steht (vergleiche Wojas *et al.*, 2007 mit Antosiewicz & Hennig, 2004). Somit bleibt also auch die Hypothese, dass *TaLCT1* selbst Calciuminflux in Pflanzenzellen vermittelt, ungewiss.

### 1.3.2. OsLCT1

Während die oben beschriebenen Ergebnisse, gewonnen aus Versuchen mit der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, eher auf *TaLCT1*-vermittelten Kationenimport schließen lassen, wurde für ein Mitglied der LCT-Familie aus Reis, *OsLCT1*, ein entgegengesetzter Wirkmechanismus postuliert (Uraguchi *et al.*, 2011). Die heterologe Expression von *OsLCT1* in *ycf1* $\Delta$ -Hefen, die eine Deletion des Gens des vakuolären Cadmiumtransporters YCF1 aufweisen (Li *et al.*, 1997), bewirkte eine verminderte Cadmiumakkumulation bei Wachstum in Medien mit 10 oder 20  $\mu\text{M}$  Cadmium. Bei höheren Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) war dieser Effekt dagegen aufgehoben. Interessanterweise hatte auch die durch *OsLCT1* verursachte geringere Anreicherung des toxischen Schwermetalls keinen erkennbar positiven oder negativen Einfluss auf

das Wachstum der  $\text{Cd}^{2+}$ -sensitiven *ycf1Δ*-Hefen (Uraguchi *et al.*, 2011). Neben Cadmium konnten auch verringerte Gehalte an Calcium, Kalium, Magnesium und Mangan gemessen werden, was zu der Vermutung führte, dass OsLCT1 den Export dieser Kationen aus der Zelle vermittelt. Der Natriumgehalt der *OsLCT1*-exprimierenden Zellen war im Gegensatz zu *TaLCT1*-exprimierenden Zellen (s.o.) nicht verändert. Während nicht bekannt ist, wo in Hefe- oder Reiszellen OsLCT1 lokalisiert ist, konnte gezeigt werden, dass ein GFP-Fusionsprotein in transformierten BY-2 Tabak-Suspensionskulturen (Nagata *et al.*, 1992) im Plasmalemma der Zellen akkumuliert (Uraguchi *et al.*, 2011).

Bei der Analyse transgener *OsLCT1*-RNAi-*knockdown* Reislinien mittels ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) zeigten sich signifikant verringerte Cadmiumgehalte in Phloemsaft und Körnern, was auf eine Rolle des Transporters sowohl bei der Wurzel-Spross-Translokation als auch der Verlagerung von Cadmium in Samen deutet. Konträr zu den Ergebnissen aus den Hefeexperimenten waren die Konzentrationen von Calcium, Kalium, Magnesium und Mangan in Körnern der RNAi-Reispflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Lediglich leicht erhöhte Eisenwerte konnten gemessen werden, was wahrscheinlich allerdings auf sekundären Effekten beruht, da, basierend auf den Resultaten der Hefeexperimente, Eisen scheinbar kein Substrat für OsLCT1 ist (Uraguchi *et al.*, 2011).

### 1.4. Auxin

Da sich im Verlauf des der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Forschungsprojekts ein Zusammenhang zwischen der Familie der *Low-affinity Cation Transporter* und Auxin zeigte, wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die wichtigsten Funktionen, die Regulation und den Transport dieses Hormons in Pflanzen wiedergegeben.

Das Phytohormon Auxin spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Entwicklung und des polaren Wachstums von Pflanzen. Es ist unter anderem an der Formgebung des Embryos und des Wurzelsystems, der Organbildung und der Regulation des gerichteten Wachstums auf sich verändernde Umweltbedingungen beteiligt.

Das mengenmäßig häufigste Auxin, Indol-3-Essigsäure (IAA), wird hauptsächlich in meristematischen Geweben des Sprosses, Blättern und Blüten gebildet und über gerichteten Transport (PAT = *polar auxin transport*) in der Pflanze verteilt. Neben IAA kommen noch weitere natürliche Auxine wie Indol-3-Buttersäure (IBA), 4-Chlor-Indol-3-Essigsäure (4-Cl-IAA) oder Phenylessigsäure (PAA) in Pflanzen vor. Synthetische Auxine wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) oder 1-Naphthylessigsäure (1-NAA) dagegen zeichnen sich oft durch eine höhere Stabilität

im Vergleich zum natürlichen IAA aus und werden deshalb in der Landwirtschaft zum Beispiel als Herbizid oder Bewurzelungshilfe verwendet.

### 1.4.1. Auxinsynthese und -speicherung

Chemisch gesehen ist IAA verwandt mit Tryptophan (Trp), und seine Biosynthese erfolgt aus dieser Aminosäure. Hierfür sind in Pflanzen verschiedene Synthesewege beschrieben, die nach intermediären Verbindungen der einzelnen Synthesereaktionen Indol-3-Acetamid (IAM), Indol-3-Pyruvat (IPA), Tryptamin (TAM) oder Indol-3-Acetaldoxim (IAOX) benannt sind. Letzteres scheint hierbei spezifisch für die Familie der Brassicaceen (Mano & Nemoto, 2012). Neben diesen Trp-abhängigen ist ein Trp-unabhängiger Biosyntheseweg beschrieben. Bei diesem erfolgt die Synthese aus der Trp-Vorstufe Indol-3-Glycerolphosphat (Ouyang *et al.*, 2000). Auxine liegen im pflanzlichen Gewebe zum größten Teil in einer stabilen Transport- und Speicherform gebunden an Aminosäuren, Peptiden oder Kohlehydraten vor. Diese inaktiven Konjugate können bei Bedarf durch hydrolysierende Enzyme in biologisch aktives Auxin umgewandelt werden (Woodward & Bartel, 2005).

### 1.4.2. Auxintransport

Neben der Synthese spielt der Transport des Hormons für die Ausbildung lokaler Auxinmaxima eine wichtige Rolle (Benková *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003). Neben dem Langstreckentransport von *Source*- zu *Sink*geweben, der im vaskulären System über das Phloem stattfindet, gibt es auch einen überwiegend gerichteten Zell-zu-Zell-Transport. Als schwache Säure liegt Indol-3-Essigsäure in der Zellwand beim apoplastischen pH-Wert (~5,5) zu etwa 17% in seiner protonierten und ungeladenen Form (IAAH) vor. Daher kann es in dieser Form passiv über die Plasmamembran ins Innere von Zellen diffundieren (Zažímalová *et al.*, 2010). Im pH-neutralen Cytoplasma (~7,0) verschiebt sich das Dissoziationsgleichgewicht des Auxins nahezu vollständig hin zur deprotonierten Form ( $\text{IAA}^- + \text{H}^+$ ), die nun aufgrund ihrer negativen Ladung die Zelle nicht mehr per Diffusion, sondern nur noch kontrolliert über Effluxtransportsysteme verlassen kann. Die weitere Annahme, dass diese Transportsysteme in Zellen polar lokalisiert sind, bildete die Grundlage des Modells der chemiosmotischen polaren Auxindiffusion (Rubery & Shelldrake, 1974; Goldsmith, 1977). Die passive Diffusion über die Plasmamembran wird zusätzlich von hoch-affinen  $\text{H}^+/\text{IAA}^-$ -Symportern der AUX1- (Auxin Resistant 1) und LAX- (Like AUX1) Proteinfamilien unterstützt, um einen aktiven Auxintransport gegen bestehende Konzentrationsgradienten zu ermöglichen (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2008; Yang & Murphy, 2009).

Dem Auxininflux in die Zelle durch Diffusion oder AUX1/LAX-Transporter steht der Efflux entgegen, der den Hauptanteil an der Aufrechterhaltung des gerichteten Auxintransports. Der Export von IAA<sup>-</sup> wird im wesentlichen von zwei Proteinfamilien vermittelt, den PINs (PIN-FORMED Efflux Carriers; s.u.) und einigen Vertretern der MDR/PGPs (Multidrug Resistance / Phosphoglycoproteins), die wiederum zur Untergruppe B der Familie der ABC- (ATP-binding cassette) Transporter gehören (Noh *et al.*, 2001). Darüberhinaus konnte auch gezeigt werden, dass die direkte Interaktion von PGP- mit PIN-Proteinen die Aktivität und Substratspezifität des Auxintransports beeinflusst (Blakeslee *et al.*, 2007).

### 1.4.2.1. PIN-Transporter

Die Familie der PINs (Gälweiler *et al.*, 1998) wird in *Arabidopsis thaliana* von acht Genen repräsentiert, die für integrale Membranproteine kodieren, für die sowohl in Hefen als auch in pflanzlichen Zellen die Fähigkeit zum Auxintransport nachgewiesen werden konnte (z.B. Petrášek *et al.*, 2006; Mravec *et al.*, 2008; Yang & Murphy, 2009). Die subzelluläre Lokalisation der PINs variiert in Abhängigkeit von der Länge einer zentral gelegenen, hydrophilen *Loop*-Domäne, die von zwei hydrophoben Bereichen mit jeweils 4 bis 5 Transmembrandomänen flankiert wird (Krecek *et al.*, 2009). Die Länge der hydrophilen Domäne führte zur Einteilung der Familie in zwei Gruppen. Die erste Gruppe, zu der PIN5, 6 und 8 gehören, zeichnet sich durch eine kürzere hydrophile Domäne aus und ist in Membranen des endoplasmatischen Retikulums zu finden. Von dieser Gruppe Endomembran-assoziiierter PINs wird angenommen, dass sie die cytosolische und nukleäre Auxinhomöostase regulieren (Mravec *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu haben PIN1, 2, 3, 4 und 7, die die zweite Gruppe bilden, eine längere hydrophile Zentraldomäne. Diese PINs sind, abhängig vom jeweiligen Protein und vom Gewebe- bzw. Zelltyp, entweder apikal, basal, lateral oder apolar in Plasmamembranen lokalisiert. So sind z.B. die in Leitbündelzellen basal lokalisierten PIN1, 3 und 7 für den polaren Transport von im Spross synthetisiertem Auxin in Richtung Wurzelspitze verantwortlich. Im Bereich der Columella regulieren hauptsächlich die apolar lokalisierten PIN3 und PIN7 den Auxinfluss in die lateralen Bereiche der Wurzelhaube (Kleine-Vehn *et al.*, 2010). In epidermalen Zellen und Zellen der lateralen Wurzelhaube apikal und in kortikalen Zellen basal lokalisiertes PIN2 spielt eine zentrale Rolle bei der Auxinzirkulation und der Aufrechterhaltung des Auxinmaximums in der Wurzelspitze (Feraru & Friml, 2008). Die Störung dieses regulierten Auxinflusses in der Wurzelspitze durch pharmakologische Behandlung mit Transportinhibitoren oder Mutation der beteiligten *PIN*-Gene führen zu Defekten in der Aufrechterhaltung des Meristems und/oder des gravitropischen Wachstums (Ottenschläger *et al.*, 2003; Luschnig *et al.*, 1998; Kleine-Vehn *et al.*, 2010; Blilou *et al.*, 2005).

## Einleitung

---

Reguliert wird die polare Lokalisation der PIN-Proteine über den Phosphorylierungsgrad bestimmter konservierter Serin- und Threoninreste der hydrophilen Domäne (Huang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung wird hierbei von Calciumbindeprotein-regulierten Kinasen wie PID (*PINOID*) oder WAG1/2 katalysiert (Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2003; Santner & Watson, 2006). Die antagonistische Dephosphorylierung benötigt dagegen eine Protein Phosphatase 2A (PP2A; Michniewicz *et al.*, 2007). Ein erhöhter Phosphorylierungsgrad, hervorgerufen durch konstitutive *PID*-Überexpression oder *PP2A*-Inaktivierung, bewirkt z.B. eine ektope Stabilisierung von PIN1 an der apikalen Seite von Stelenzellen. Derartige Veränderungen bewirken eine Störung des natürlichen Auxinflusses, gefolgt von starken Defekten während der Embryogenese oder des gerichteten Wurzelwachstums (Christensen *et al.*, 2000; Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007).

Verschiedene endogene Prozesse (z.B. Übergang zwischen verschiedenen Stadien der Embryogenese) und exogene Einflüsse (z.B. Wechsel der Lichtverhältnisse oder des Gravitationsvektors) machen dynamische Veränderungen des Auxinflusses notwendig, damit Pflanzen auf entsprechende Reize adäquat reagieren können. Um dies zu gewährleisten, unterliegen die PIN-Proteine ständigen endo- und exocytotischen Transportprozessen, durch die ihre Abundanz und ihre subzelluläre Lokalisation, je nach Phosphorylierungsgrad, entsprechend den Erfordernissen angepasst werden kann (Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

Die *de novo* Synthese integraler Proteine, wie der PINs, sowie ihr Einbau in Membranen beginnt am endoplasmatischen Retikulum. Während des weiteren Transportprozesses, der über die Zisternen des Golgi-Apparats anterograd von *cis*- in *trans*-Richtung hin zum trans-Golgi Netzwerk (TGN) verläuft, finden weitere Proteinmodifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, statt (Grunewald & Friml, 2010). Im TGN, welches in Pflanzen auch äquivalent zu frühen Endosomen ist (Lam *et al.*, 2007), vereinen sich sekretorische und endocytotische Transportwege (Dettmer *et al.*, 2006; Viotti *et al.*, 2010). Mutationen oder pharmakologische Behandlungen, die die Transport- und Sortierungsfunktionen dieses Kompartiments beeinflussen, ziehen oftmals schwere Störungen in Wachstum, Entwicklung und Stresstoleranz der Pflanzen nach sich (z.B.: Zouhar *et al.*, 2009; Gendre *et al.*, 2011; Uemura & Nakano, 2013).

Die Endocytose der PIN-Proteine beginnt an der Plasmamembran mit der Internalisierung von Membranen und der Bildung Clathrin-beschichteter Vesikel. Diese fusionieren im weiteren Verlauf mit dem TGN, wo die Proteine sortiert und entweder zum Abbau über späte Endosomen (auch oft als Multivesicular Bodies (MVBs) oder Prevacuolar Compartment (PVC) bezeichnet) zur Vakuole, oder über Recycling-Endosomen zurück zur Plasmamembran transportiert werden (Grunewald & Friml, 2010). Die Regulation dieser Transportprozesse erfolgt u.a. über ARF (ADP-Ribosylation Factor)-GTPasen und ihre korrespondierenden GAPs (GTPase-Activating

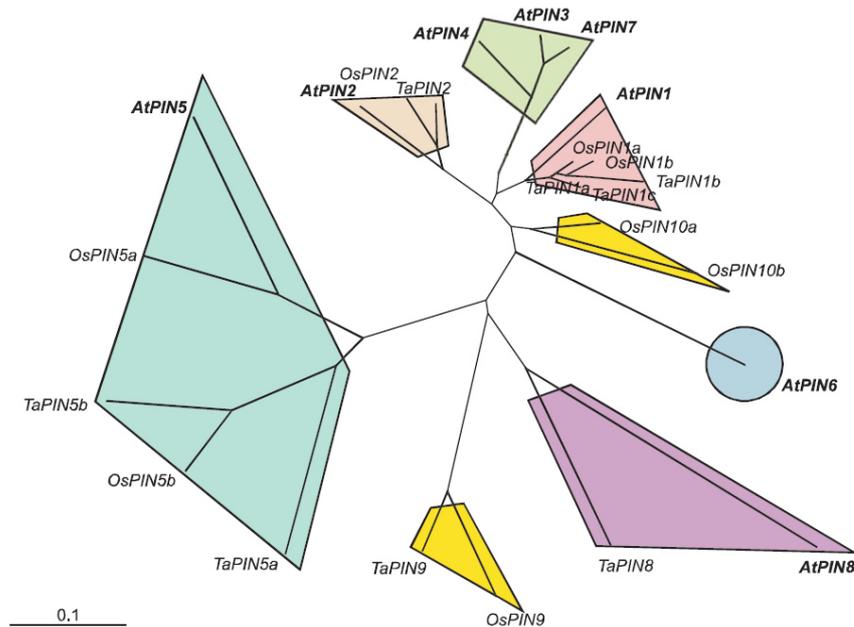
Proteins) und GEFs (Guanine-Nucleotide-Exchange Factors) (Vernoud *et al.*, 2003). Der bestuntersuchte Vertreter der GEFs in Pflanzen wird durch das *GNOM*-Gen kodiert (Mayer *et al.*, 1991; Steinmann *et al.*, 1999). Zahlreiche Studien belegen, dass eine Verminderung der *GNOM*-Aktivität durch Mutationen oder Behandlung mit Inhibitoren, wie Brefeldin A (BFA), die Lokalisation der PINs (und anderer Proteine) beeinflusst, was wiederum u.a. Auxin-assoziierte Wachstumsstörungen nach sich zieht (z.B. Geldner *et al.*, 2001; Geldner *et al.*, 2004). Neben den ARF-GTPasen und ihren Interaktionspartnern sind aber mittlerweile auch viele weitere Faktoren (z.B. *Trafficking*-Regulatoren, Kationenkanäle, Lipide) beschrieben, die in der Regulation der PIN-Lokalisation und damit des polaren Auxintransports involviert sind (z.B. Hazak *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Dolan, 2013; Ischebeck *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014).

### 1.4.2.2. PINs in Süßgräsern

Zwar sind die PINs die am besten untersuchte Familie der Auxintransporter in Pflanzen, ihre genaue Rolle, ihr Zusammenspiel und ihre Regulation in Monokotyledonen wie den Süßgräsern ist allerdings noch weitgehend unbekannt (Balzan *et al.*, 2014). Bioinformatische Untersuchungen zur Phylogenie zeigen, dass *PIN1* und *PIN5*, im Unterschied zu *Arabidopsis*, in Süßgräsern wie Reis oder Weizen in mehreren Kopien vorliegen (Abb. 1.2). Diese sind zwar ursprünglich infolge segmentaler Genomduplikationen entstanden, allerdings deuten, wie im Fall von Reis, unterschiedliche Expressionsmuster auf möglicherweise nicht-redundante Funktionen hin (Wang *et al.*, 2009). Weiterhin belegen die Untersuchungen die Existenz mindestens einer Monokotyledonen-spezifischen Gruppe von *PINs* (*PIN9*), die in dikotylen Pflanzen allem Anschein nach nicht vorhanden ist (Paponov *et al.*, 2005; Balzan *et al.*, 2014).

Für *PIN3*, *4*, *6* und *7* sind im Fall von *Arabidopsis* essentielle Rollen beim polaren Auxintransport beschrieben. Pflanzen, die in diesen Genen mutiert sind, zeigen z.T. schwere Defekte während der frühen Embryogenese (Friml *et al.*, 2003), im tropistischen Wachstum oder der Entwicklung von Spross, Primär- und Seitenwurzeln (Friml *et al.*, 2002; Blilou *et al.*, 2005; Kleine-Vehn *et al.*, 2010; Cazzonelli *et al.*, 2013). Interessanterweise scheinen allerdings homologe Vertreter dieser Gene in Süßgräsern zu fehlen (Abb. 1.2; Wang *et al.*, 2009; Forestan *et al.*, 2012).

Des Weiteren gibt es zwar, wie bereits angedeutet, einige Studien, die sich mit Expressionsprofilen z.B. in Reis, Mais oder Hirse beschäftigen (Wang *et al.*, 2009; Forestan *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2010), funktionelle Charakterisierungen monokotyler PIN-Proteine im Hinblick auf Transporteigenschaften, Substratspezifitäten, subzelluläre Lokalisationen oder allgemein der Phänotypisierung mis-exprimierender Mutanten sind allerdings noch selten (Balzan *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.2. Phylogenie der PIN-Auxintransporter in Weizen (*Triticum aestivum*), Reis (*Oryza sativa*) und *Arabidopsis thaliana* (Paponov *et al.*, 2005 (modifiziert)).**

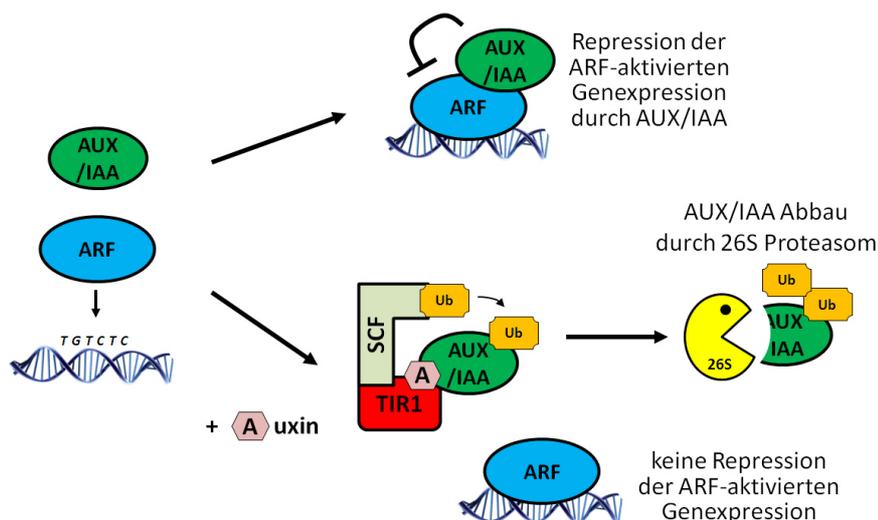
Die wenigen zur Zeit vorliegenden Ergebnisse deuten darüberhinaus darauf hin, dass die bisher aus den Untersuchungen der *Arabidopsis*-PINs gewonnenen Erkenntnisse nicht immer ohne Weiteres auf andere Arten übertragen werden können. Beispielsweise spielt PIN1 in *Arabidopsis* eine wichtige Rolle bei der Initiierung und der Entwicklung von Seitenwurzelsprimordien (Benková *et al.*, 2003), während eine durch RNAi verringerte Expression von *OsPIN1* in Reispflanzen keinen Effekt auf die Seitenwurzelsbildung hatte (Xu *et al.*, 2005). Dafür hatten die Pflanzen eine, im Vergleich zum Wildtyp, geringere Anzahl an Adventivwurzeln sowie eine höhere Anzahl an Bestockungstrieben (Xu *et al.*, 2005). *Arabidopsis*-Pflanzen, die dagegen *AtPIN1* ektop überexprimieren, zeigten unter anderem starken Wurzelgravitropismus und reduziertes Primärwurzelswachstum (Mravec *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu hatten *OsPIN1*-überexprimierende Reispflanzen keinen Defekt im Wurzelgravitropismus und, im Vergleich zum Wildtyp, längere Primärwurzeln, aber ein verringertes Sprosswachstum (Xu *et al.*, 2005).

### 1.4.3. Auxinperzeption und Auxin-regulierte Genexpression

Unterschiedliche Auxinkonzentrationen führen auf zellulärer Ebene zu einer Veränderung der Genexpression (Abb. 1.3). Diese wird aktiviert oder reprimiert durch bestimmte Transkriptionsfaktoren, die ARFs (Auxin Response Factors), die *cis*-regulatorische Promotorelemente, so genannte Auxin Response Elements (AuxRE) binden. Die AuxREs haben die kanonische Konsensussequenz *TGTCTC*, welche auch degeneriert (*TGTCNN*) und sowohl in Plus- als auch Minusrichtung in Promotoren

## Einleitung

Auxin-induzierter Gene vorliegen kann (Ulmasov *et al.*, 1995; Mironova *et al.*, 2014). Niedrige Auxinkonzentrationen führen zu einer Inhibition der ARF-Transkriptionsfaktoren durch Bindung von AUX/IAAs (Auxin/Indole-Acetic Acid proteins) und damit zur Repression ARF-regulierter Genexpression (Ulmasov *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu steigern höhere Auxinkonzentrationen die Wahrscheinlichkeit, dass Auxinmoleküle an TIR1- (Transport Inhibitor Response 1) oder TIR1-like-Proteine binden, was wiederum deren Interaktion mit AUX/IAA-Proteinen stabilisiert. Das zur Familie der F-Box-Proteine gehörende TIR1 fungiert somit als Auxinrezeptor und ist Teil des so genannten SCF<sup>TIR1</sup> Komplexes (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski & Leyser, 2005). SCF<sup>TIR1</sup> (Skp1-Cul1-E-Box) ist ein Multiproteinkomplex, der die Ubiquitinierung des gebundenen AUX/IAAs katalysiert und dieses somit für die Degradation durch das 26S-Proteasom markiert. Als Folge können AUX/IAA-Proteine nun nicht mehr die Funktion der ARF-Transkriptionsfaktoren hemmen, was zur Aktivierung der Expression entsprechender *Auxin-Response* Gene führt (Gray *et al.*, 2001; Mockaitis & Estelle, 2008).



**Abbildung 1.3. Modell der Auxin-vermittelten Regulation von Genexpression.**

Einzelheiten finden sich im Text. Die Abbildung wurde modifiziert erstellt nach Mockaitis & Estelle, 2008.

Beispiele für Auxin-induzierte Gene sind neben AUX/IAAs selbst (Abel *et al.*, 1995), Gene, deren Produkte den Transport von Auxin (z.B. PINs, Vieten *et al.*, 2005; LAXs, Péret *et al.*, 2012) oder das *Trafficking* der Transporter vermitteln (z.B. ROP3, Huang *et al.*, 2014). Daneben konnte aber auch für einige Kalium-permeable Ionenkanäle, die unmittelbar an Auxin-assoziierten Wachstumsreaktionen beteiligt sind (z.B. Zellstreckung beim Koleoptilenwachstum), eine Induktion der Genexpression durch exogen zugeführtes Auxin nachgewiesen werden (Philippar *et al.*, 2004; Philippar *et al.*, 2006).

### 1.5. Ziel der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der funktionellen Analyse des Gens *TaLCT1*, welches für einen putativen Kationentransporter aus Weizen (*Triticum aestivum*) kodiert. Wie bereits erwähnt, basieren die bisherigen Kenntnisse über *TaLCT1* auf Ergebnissen heterologer Expressionsversuche mit Hefezellen (Schachtman *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 1998; Amtmann *et al.*, 2001) und Tabak (Antosiewicz & Hennig, 2004; Wojas *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse lassen auf eine mögliche Beteiligung des Gens bei der Regulation der zellulären Kationenhomöostase und/oder der Generierung bzw. Modulation Stress-induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale schließen. Zur Überprüfungen dieser Hypothesen sollten luminometrische Messungen mit transgenen, den genetisch kodierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Reporter *APOAEQUORIN*-exprimierenden Hefezellen durchgeführt werden. Da weiterhin der Transport von Kationen über biologische Membranen oftmals an Protonengradienten gekoppelt ist, sollte auch der Einfluss von *TaLCT1* auf den zellulären pH-Wert untersucht werden. Dazu sollten ratiometrische Fluoreszenzmessungen mit Hefezellen durchgeführt werden, die das Gen für das pH-sensitive *Green Fluorescent Protein*-Derivat pHLuorin exprimieren.

Ebenfalls auf der Grundlage der bisherigen Versuche wurde eine Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran der *TaLCT1*-exprimierenden Hefezellen und analog auch in Weizenzellen postuliert. Allerdings wurde diese Vorhersage in keiner bisher veröffentlichten Studie experimentell bestätigt oder widerlegt. Da jedoch die Kenntnis darüber, in welchen zellulären Membranen und Kompartimenten *TaLCT1* aktiv ist, unverzichtbar für die Beschreibung einer möglichen physiologischen Funktion ist, bestand ein weiteres Ziel der Arbeit in der Feststellung der Lokalisation des *TaLCT1*-Proteins in Weizenzellen und heterologen Expressionssystemen durch GFP/YFP-Fusion und Kolo-kalisation mit fluoreszierenden Markerproteinen.

Um weitere Informationen über eine mögliche Rolle des Gens in Pflanzen zu erhalten, sollten transgene, stabil *TaLCT1*-exprimierende Gerste- und Arabidopsis-Linien erstellt und phänotypisch untersucht werden. Diese Ansätze wurden gewählt, da die Transformation von Weizen sehr langwierig und in dem für das Projekt festgesetzten Zeitrahmen nicht möglich gewesen wäre.

Ein Nebenziel der Arbeit bestand darüber hinaus in der Suche und gegebenenfalls ersten funktionellen Charakterisierung möglicher weiterer Mitglieder der Familie der *Low-affinity Cation Transporter (LCTs)* in Gerste.

Basierend auf den Ergebnissen der subzellulären Lokalisation sowie der phänotypischen Analysen transgener Pflanzen und Hefen sollte nach Möglichkeit eine physiologische Rolle der Süßgras-spezifischen *LCTs* formuliert werden. Dies wiederum könnte dann als gezielter Ausgangspunkt für zukünftige, langwierigere Untersuchungen der Genfamilie (z.B. in *TaLCT1*-mis-exprimierenden Weizenpflanzen) dienen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Tabelle 2.1.1 Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Chemikalien

Substanzname	chemische Formel oder Abkürzung	Hersteller / Vertreiber
1-Naphthylessigsäure	Abk.: 1-NAA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	Abk.: 2,4-D	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
2-(N-Morpholino)ethan sulfonsäure	Abk.: MES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3,6-Dichlor-2-methoxybenzoesäure	Abk.: Dicamba	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure	Abk.: X-Gluc	X-Gluc Direct, Spanien ( <a href="http://www.x-gluc.com/">http://www.x-gluc.com/</a> )
6-Benzylaminopurin	Abk.: BAP	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
Acetosyringon	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar A7921 (Plant cell culture tested)	(C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>n</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar Agar, Kobe I	(C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>n</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumnitrat	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumsulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Estradiol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biotin	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Brefeldin A	Abk.: BFA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calciumnitrat Tetrahydrat	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	Honeywell Riedl-de Haën, Seelze, Deutschland
Calcium-Pantothenat	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloralhydrat	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coelenterazin	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Complete Supplement Mixture</i> (ohne Urazil)	Abk.: CSM-Ura	ForMedium, Hunstanton, GB
<i>Complete Supplement Mixture</i> (ohne Leucin)	Abk.: CSM-Leu	ForMedium, Hunstanton, GB
<i>Complete Supplement Mixture</i> (ohne Leucin und Urazil)	Abk.: CSM-Leu-Ura	ForMedium, Hunstanton, GB

## Material und Methoden

Substanzname	chemische Formel oder Abkürzung	Hersteller / Vertreiber
Cyclopiazonsäure	Abk.: CPA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D(+) Galactose	$C_6H_{12}O_6$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+) Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+) Maltose Monohydrat	$C_{12}H_{22}O_{11} \times H_2O$	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
D(+) Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosid-triphosphate (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Abk.: dNTPs	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Digitonin	$C_{56}H_{92}O_{29}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Abk.: DMSO	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
D-Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
D-Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisen(III)-chlorid	$FeCl_3$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Ethanol	$CH_2H_6O$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Abk.: EDTA	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Ethylenglycol-bis(aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Abk.: EGTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fleischextrakt	-	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FM4-64 (SynptoRed C2)	$C_{30}H_{45}Br_2N_3$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Folsäure	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	$C_3H_8O_3$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	-	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lugol'sche Lösung (1%) (gebrauchsfertig)	$I_2KI$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	$C_3H_8O$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
Kaliumdihydrogenphosphat Trihydrat	$KH_2PO_4 \times 3 H_2O$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Kaliumhexacyanoferrat (II)	$K_4[Fe_2(CN)_6]$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Kaliumhexacyanoferrat (III)	$K_3[Fe_2(CN)_6]$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Kaliumhydroxid	KOH	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Kaliumiodid	KI	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	$CuSO_4 \times 5 H_2O$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Lachsspermien-DNA	-	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Arginin	$C_6H_{14}N_4O_2$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA

## Material und Methoden

Substanzname	chemische Formel oder Abkürzung	Hersteller / Vertreiber
L-Prolin	$C_5H_9NO_2$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Lithiumacetat	$CH_3COOLi$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lithiumchlorid	$LiCl$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	VWR, Radnor, USA
Mangansulfat Monohydrat	$MnSO_4 \times H_2O$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	$CH_3OH$	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Murashige &amp; Skoog Medium (Basal Salt Mixture) M0221</i>	Abk.: MS (BSM)	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
<i>Murashige &amp; Skoog Medium (ohne <math>NH_4NO_3</math>) M0238</i>	Abk.: MS- $NH_4NO_3$	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
myo-Inositol	$C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
N-1-Naphthylphthalamidsäure (Naptalam)	Abk.: NPA	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Natriumacetat	$CH_3COONa$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Natriumchlorid / Kochsalz	$NaCl$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	$NaH_2PO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat	Abk.: SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochlorit (12%)	$NaClO$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriummolybdat Dihydrat	$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	Honeywell Riedl-de Haën, Seelze, Deutschland
Niacin	$C_6H_5NO_2$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-Aminobenzoessäure	$C_7H_7NO_2$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Pepton (Caseinhydrolysat)	-	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
Phosphatgepufferte Salzlösung	Abk.: PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphorsäure (85%)	$H_3PO_4$	Honeywell Riedl-de Haën, Seelze, Deutschland
Phyto-Agar	-	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande
Polyethylenglycol 3350	Abk.: PEG 3350	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Polyethylenglycol 4000	Abk.: PEG 4000	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Propidiumiodid	$C_{27}H_{34}I_2N_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyridoxin-HCl	$C_8H_{12}ClNO_3$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (Fraktion V Proteasefrei)	Abk.: BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (37%)	$HCl$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Silwet L77	$C_{13}H_{34}O_4Si_3$	Lehle Seeds, Round Rock, USA
SYBR <sup>®</sup> Safe - DNA Gel stain	-	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA
Thiamin-HCl	$C_{12}H_{17}ClN_4OS \times HCl$	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande

## Material und Methoden

Substanzname	chemische Formel oder Abkürzung	Hersteller / Vertreiber
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Abk.: TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, USA
Trypton	-	ForMedium, Hunstanton, GB
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Yeast Nitrogen Base without Aminoacids and without <math>(NH_4)_2SO_4</math></i>	Abk.: YNB -AA - $(NH_4)_2SO_4$	ForMedium, Hunstanton, GB
Zinksulfat Heptahydrat	$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	$C_6H_8O_7$	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.2. Antibiotika und Herbizide

**Tabelle 2.1.2** Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Antibiotika und Herbizide zur Selektion transgener Bakterien und Pflanzen

Substanzname	chemische Formel	Hersteller / Vertreiber	Selektion von	verwendete Konzentration im Medium
Ampicillin (Natriumsalz)	$C_{16}H_{18}N_3O_4SNa$	Duchefa Biochem. B.V., Harleem, NL	<i>E. coli</i>	$100 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
BASTA® (Glufosinat-Ammonium)	$C_5H_{15}N_2O_4P$	Bayer, Leverkusen, Deutschland	<i>A. thaliana</i>	$0,2 \text{ g} * \text{L}^{-1}$ (Sprühhösung)
Bialaphos (Natriumsalz)	$C_{11}H_{21}N_3NaO_6P$	TOKU-E, Washington, USA	<i>H. vulgare</i>	$2,5 - 5,0 \text{ mg} * \text{L}^{-1}$
Carbenicillin (Di-Natrium)	$C_{17}H_{16}N_2Na_2O_6S$	Duchefa Biochem. B.V., Harleem, NL	<i>A. tumefaciens</i> (AGL-1)	$25 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
G418/Geneticin (Disulfat)	$C_{20}H_{40}N_4O_{10} \times 2 H_2SO_4$	Roth, Karlsruhe, Deutschland	<i>S. cerevisiae</i>	unterschiedlich, je nach Experiment
Gentamicin (Sulfat)	Stoffgemisch	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)	$25 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
Hygromycin B	$C_{20}H_{37}N_3O_{13}$	Roth, Karlsruhe, Deutschland	<i>A. thaliana</i>	$20 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
			<i>H. vulgare</i>	$50 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
Kanamycin (Sulfat)	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \times H_2SO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	<i>E. coli</i>	$50 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
			<i>A. tumefaciens</i>	$50 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
Spectinomycin (HCl-Pentahydrat)	$C_{14}H_{24}N_2O_7 \times 2 HCl \times 5 H_2O$	Duchefa Biochem. B.V., Harleem, NL	<i>E. coli</i>	$25 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
			<i>A. tumefaciens</i>	$25 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
Streptomycin (Sulfat)	$C_{21}H_{39}N_7O_{12} \times 1,5 H_2SO_4$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	<i>E. coli</i> (TOP10)	$50 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
Tetracyclin (Hydrochlorid)	$C_{15}H_{24}N_2O_2 \times HCl$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)	$10 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$
Ticarcillin (Di-Natrium) + Clavulanate K (15 : 1)	$C_{15}H_{14}N_2Na_2O_6S_2 + C_8H_8NO_5K$	Duchefa Biochem. B.V., Harleem, NL	<i>A. tumefaciens</i>	$150 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1}$

### 2.1.3. Enzyme

**Tabelle 2.1.3** Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller / Vertreiber	verwendet für
Cellulase (Onozuka R10)	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande	enzymatischer Abbau von Zellwänden bei Protoplastenisolation (Kpt. 2.2.2.3)
Cellulase (Onozuka RS)	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande	enzymatischer Abbau von Zellwänden bei Protoplastenisolation (Kpt. 2.2.2.3)
CIP (Calf Intestinal alkaline Phosphatase)	New England Biolabs, Ipswich, GB	Dephosphorylierung von DNA- Fragmenten (Kpt. 2.2.1.9.3)
DNase I (RNase-frei)	Omega Bio-tek Inc, Norcross, USA	Hydrolyse von DNA bei der Isolation von RNA (Kpt. 2.2.1.2)
GoTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA	Screening-PCR (Kpt. 2.2.1.5)
Hemicellulase (H2125)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	enzymatischer Abbau von Zellwänden bei Protoplastenisolation (Kpt. 2.2.2.3)
Klenow-Fragment (DNA- Polymerase I)	New England Biolabs, Ipswich, GB	Entfernung einzelsträngiger DNA- Überhänge ( <i>Blunting</i> ) (Kpt. 2.2.1.9.2)
Macerase (R10)	Duchefa Biochemie B.V., Harleem, Niederlande	enzymatischer Abbau von Zellwänden bei Protoplastenisolation (Kpt. 2.2.2.3)
M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H <sup>-</sup>	New England Biolabs, Ipswich, GB	cDNA-Synthese (Kpt. 2.2.1.3)
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Finnzymes), Waltham, USA	PCR-Amplifikation mit <i>ProofReading</i> (Kpt. 2.2.1.5)
Q5 <sup>®</sup> High-Fidelity DNA- Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, GB	PCR-Amplifikation mit <i>ProofReading</i> (Kpt. 2.2.1.5)
Restriktionsendonuklease (diverse)	New England Biolabs, Ipswich, GB	spezifische Hydrolyse von DNA- Fragmenten (Kpt. 2.2.1.9.1)
RNase A	Thermo Fisher Scientific (MBI Fermentas), Waltham, USA	RNA-Hydrolyse nach cDNA-Synthese (Kpt. 2.2.1.3)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA	cDNA-Synthese (Kpt. 2.2.1.3)
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, GB	Ligation von DNA-Fragmenten (Kpt. 2.2.1.9.4)

### 2.1.4. Kulturmedien

Nachfolgend finden sich die Rezepte zur Herstellung der verwendeten Kulturmedien für die Anzucht von Bakterien, Hefen und Pflanzen.

#### **LB-Medium (*Lyso*geny *Broth*)**

10 g * L <sup>-1</sup>	Trypton
5 g * L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
10 g * L <sup>-1</sup>	Natriumchlorid

- gelöst in H<sub>2</sub>O<sub>dem</sub>
- für Festmedium: 15 g \* L<sup>-1</sup> Agar-Agar Kobe I

#### **YEB-Medium (*Yeast Extract Broth*)**

1 g * L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
5 g * L <sup>-1</sup>	Fleischextrakt
5 g * L <sup>-1</sup>	Pepton (Caseinhydrolysat)
5 g * L <sup>-1</sup>	D(+) Saccharose
2 mM	Magnesiumchlorid

- gelöst in H<sub>2</sub>O<sub>dem</sub>
- für Festmedium: 15 g \* L<sup>-1</sup> Agar-Agar Kobe I

#### **SOC-Medium (*Super optimal broth with catabolite repression*)**

20 g * L <sup>-1</sup>	Trypton
5 g * L <sup>-1</sup>	Hefeextrakt
10 mM	Natriumchlorid
2,5 mM	Kaliumchlorid
10 mM	Magnesiumchlorid
10 mM	Magnesiumsulfat

- gelöst in mqH<sub>2</sub>O

### **SC-Medium (Synthetic Complete)**

0,77 g * L <sup>-1</sup>	Complete Supplement Mixture ohne Urazil (CSM-Ura) !!! Menge variiert je nach Art des CSM → Angaben des Herstellers beachten
1,9 g * L <sup>-1</sup>	Yeast-Nitrogen Base (ohne Aminosäuren und ohne (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
5 g * L <sup>-1</sup>	Ammoniumsulfat (alternativ: 76 mM Ammoniumchlorid bei Versuchen mit höheren Ca-Konzentrationen im Medium)
20 g * L <sup>-1</sup>	D(+) Glucose (alternativ: 20 g * L <sup>-1</sup> D(+) Galactose → steril nach dem Autoklavieren dazu)

- gelöst in mqH<sub>2</sub>O
- für Festmedium: 15 g \* L<sup>-1</sup> Agar-Agar Kobe I (für normale Hefe-Kultivierung) oder 15 g \* L<sup>-1</sup> Agar A7921 (für Hefe-Wachstumsversuche (Drop-Assays))
- pH 5,5 einstellen mit KOH bzw. HCl (auf eventuell abweichende pH-Werte in spezifischen Versuchen wird an entsprechender Stelle hingewiesen)

### **AP-Medium (Arginin-Phosphat)**

0,77 g * L <sup>-1</sup>	Complete Supplement Mixture ohne Urazil (CSM-Ura) !!! Menge variiert je nach Art des CSM → Angaben des Herstellers beachten
10 mM	L-Arginin
7 mM	Kaliumchlorid
540 µL * L <sup>-1</sup>	Phosphorsäure (85%) (entspricht 8 mM Endkonzentration)
0,2 mM	Calciumchlorid
2 mM	Magnesiumsulfat
0,2 µM	Kupfer(II)-sulfat
2,4 µM	Mangansulfat
1,4 µM	Zinksulfat
0,6 µM	Kaliumiodid
0,8 µM	Natriummolybdat
8,1 µM	Borsäure
1,2 µM	Eisen(III)-chlorid
2 µg * L <sup>-1</sup>	Biotin
0,2 mg * L <sup>-1</sup>	Calcium-Pantothenat
2 µg * L <sup>-1</sup>	Folsäure
2 mg * L <sup>-1</sup>	myo-Inositol
0,4 mg * L <sup>-1</sup>	Niacin
0,2 mg * L <sup>-1</sup>	p-Aminobenzoesäure

## Material und Methoden

---

0,4 mg \* L<sup>-1</sup> Pyridoxin-HCl  
0,2 mg \* L<sup>-1</sup> Riboflavin  
0,4 mg \* L<sup>-1</sup> Thiamin-HCl  
20 g \* L<sup>-1</sup> D(+) Glucose (alternativ: 20 g \* L<sup>-1</sup> D(+) Galactose → steril nach dem Autoklavieren dazu)

- gelöst in mqH<sub>2</sub>O
- für Festmedium: 15 g \* L<sup>-1</sup> Agar A7921
- pH 6,0 einstellen mit L-Arginin-Lösung (auf eventuell abweichende pH-Werte in spezifischen Versuchen wird an entsprechender Stelle hingewiesen)

### 1/2 MS-Medium (*Half-strength Murashige & Skoog*)

2,2 g \* L<sup>-1</sup> *Murashige & Skoog Medium (Basal Salt Mixture)*  
10 g \* L<sup>-1</sup> D(+) Saccharose

- gelöst in mqH<sub>2</sub>O;
- für Festmedium: 8 g \* L<sup>-1</sup> Phyto-Agar
- pH 5,7 einstellen mit KOH bzw. HCl

## 2.1.5. Plasmidvektoren

Tabelle 2.1.4 Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Plasmidvektoren

Plasmid	verwendet für	Referenz / Quelle	Selektion mit	in Organismus
<i>pART7</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	Gleave, 1992	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pART7-EYFP</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	Peiter <i>et al.</i> , 2007	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pART7-HvLCT2-EYFP</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pART7-mCherry_nost</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pART7-mCherry-AtSYP61</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pART7-TaLCT1</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pART7-TaLCT1-EYFP</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pBART</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9); funktionelle Analyse in Tabak (Kpt. 3.1) (Kontrolle)	Peiter <i>et al.</i> , 2007	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
<i>pBART-EYFP</i>	funktionelle Analyse in <i>A. thaliana</i> und Tabak (Kpt. 3.1) (Kontrolle)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			BASTA <sup>®</sup>	<i>A. thaliana</i>
<i>pBART-HvLCT2-EYFP</i>	Lokalisation in Tabak (Kpt. 3.9)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
<i>pBART-mCherry-AtSYP61</i>	Lokalisation in Tabak (Kpt. 3.5.3)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
<i>pBART-TaLCT1</i>	funktionelle Analyse in <i>A. thaliana</i> und Tabak (Kpt. 3.1)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			BASTA <sup>®</sup>	<i>A. thaliana</i>
<i>pBART-TaLCT1-EYFP</i>	Lokalisation in Tabak (Kpt. 3.5.3)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
<i>pER8 (= pER8-XVE)</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	Zuo <i>et al.</i> , 2000	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Hygromycin B	<i>A. thaliana</i>

## Material und Methoden

Plasmid	verwendet für	Referenz / Quelle	Selektion mit	in Organismus
<i>pER8-XVE-EYFP</i>	funktionelle Analyse in <i>A. thaliana</i> (Kpt. 3.2) (Kontrolle)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Hygromycin B	<i>A. thaliana</i>
<i>pER8-XVE-EYFP-TaLCT1</i>	Lokalisation in <i>A. thaliana</i> (Kpt. 3.5.1)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Hygromycin B	<i>A. thaliana</i>
<i>pER8-XVE-TaLCT1</i>	funktionelle Analyse in <i>A. thaliana</i> (Kpt. 3.2)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Hygromycin B	<i>A. thaliana</i>
<i>pER8-XVE-TaLCT1-EYFP</i>	Lokalisation in <i>A. thaliana</i> (Kpt. 3.5.1)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Hygromycin B	<i>A. thaliana</i>
<i>pEVP11-AEQ</i>	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> -Messungen in Hefe (Kpt. 2.2.3.2)	Batiza <i>et al.</i> , 1996	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pFGC_G-rb</i> (= GmMAN1-Cherry)	Lokalisation in Tabak (Kpt. 3.5.3) (Marker)	Nelson <i>et al.</i> , 2007	Medium ohne Leucin	<i>S. cerevisiae</i>
			Kanamycin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pFGC_mt-rb</i> (= ScCOX4-mCherry)	Lokalisation in Tabak (Kpt. 3.5.3) (Marker)	Nelson <i>et al.</i> , 2007	Kanamycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Kanamycin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pFGC_px-rb</i> (= mCherry-PTS1)	Lokalisation in Tabak (Kpt. 3.5.3) (Marker)	Nelson <i>et al.</i> , 2007	Kanamycin	<i>A. tumefaciens</i> (GV3101)
			Kanamycin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pGEM-HvLCT2_stop</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pGEM-mCherry_nost</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pGEM®-T</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	Promega, Madison, USA	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pGEM-TaLCT1_stop</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pJR1138</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	Rodríguez-Concepción <i>et al.</i> , 1999	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pJR1138-mCherry_nost</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pJR1138-mCherry-ScGOS1</i>	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.2) (Marker)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Leucin	<i>S. cerevisiae</i>

## Material und Methoden

Plasmid	verwendet für	Referenz / Quelle	Selektion mit	in Organismus
<i>pJR1138-mCherry-ScPEP12</i>	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.2) (Marker)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Leucin	<i>S. cerevisiae</i>
<i>pJR1138-mCherry-ScSED5</i>	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.2) (Marker)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Leucin	<i>S. cerevisiae</i>
<i>pJR1138-mCherry-ScTLG1</i>	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.2) (Marker)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Leucin	<i>S. cerevisiae</i>
<i>pJR1138-pHLuorin</i>	pH-Messungen in Hefe (Kpt. 3.8.5)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Leucin	<i>S. cerevisiae</i>
<i>pLH6000-YC3.6</i>	Gerste-Transformation (Kpt. 3.1) (Kontrolle)	Peiter <i>et al.</i> , nicht publiziert	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (AGL-1)
			Hygromycin B	<i>H. vulgare</i>
<i>pLH7000</i>	Klonierung; funktionelle Analyse in Gerste (Kpt. 3.1) (Kontrolle)	DNA Cloning Service e.K., Hamburg, Deutschland	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (AGL-1)
			Bialaphos	<i>H. vulgare</i>
<i>pLH7000-TaLCT1</i>	funktionelle Analyse in Gerste (Kpt. 3.1)	vorliegende Arbeit	Spectinomycin	<i>E. coli</i> (XL1-Blue)
			Spectinomycin	<i>A. tumefaciens</i> (AGL-1)
			Bialaphos	<i>H. vulgare</i>
<i>pUBI-AB</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	DNA Cloning Service e.K., Hamburg, Deutschland	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pUBI-AB-EYFP</i>	Klonierung; Lokalisation in Weizen-Protoplasten (Kpt. 3.5.2) (Kontrolle)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pUBI-AB-HvLCT2-EYFP</i>	Lokalisation in Gerste-Protoplasten (Kpt. 3.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pUBI-AB-TaLCT1_stop</i>	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)
<i>pUBI-AB-TaLCT1-EYFP</i>	Lokalisation in Weizen-Protoplasten (Kpt. 3.5.2)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E. coli</i> (TOP10)

## Material und Methoden

Plasmid	verwendet für	Referenz / Quelle	Selektion mit	in Organismus
pYES2®	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9); funktionelle Analyse in Hefe (Kpt. 3.8) (Kontrolle)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>
pYES2-EYFP	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.3) (Kontrolle)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>
pYES2-EYFP-TaLCT1	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.1)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>
pYES2-HvLCT2	funktionelle Analyse in Hefe (Kpt. 3.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>
pYES2-HvLCT2-EYFP	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>
pYES2-P <sub>ACT1</sub> ::mt_pHLuorin	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	Orij <i>et al.</i> , 2009	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
pYES2-pmUbi-MCS-HvLCT2(nost)-TAG	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
pYES2-pmUBI-MCS-TAG	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
pYES2-pmUBI-MCS-TaLCT1_nost-TAG	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
pYES2-pmUBI-MCS-TaLCT1_stop	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
pYES2-pmUBI-MCS-TaLCT1_stop-TAG	Klonierung (Kpt. 2.2.1.9)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
pYES2-TaLCT1	funktionelle Analyse in Hefe (Kpt. 3.8)	Amtmann <i>et al.</i> , 2001	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>
pYES2-TaLCT1-EYFP	Lokalisation in Hefe (Kpt. 3.8.1)	vorliegende Arbeit	Ampicillin	<i>E.coli</i> (TOP10)
			Medium ohne Urazil	<i>S. cerevisiae</i>

### 2.1.6. Oligonukleotide

Tabelle 2.1.5 Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide (*Primer*).  
Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Labor-interne Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Gen / Plasmid	ggf. Gennummer	Restriktions-schnittstelle	verwendet für
At4g05320_rt_F	CACACTCCACTTGGTCTTGCGT	<i>AtUBQ10</i>	AT4G05320	-	sqRT-PCR
At4g05320_rt_R	TGGTCTTCCGGTGAGAGTCTTCA	<i>AtUBQ10</i>	AT4G05320	-	sqRT-PCR
AtSYP61_f	AAAAATCTAGAATGTCTTCAGCTCAAGATCCAT	<i>AtSYP61</i>	AT1G28490	<i>Xba</i> I	Klonierung
AtSYP61_r	AAAAATCTAGATTAGGTCAAGAAGACAAGAACG	<i>AtSYP61</i>	AT1G28490	<i>Xba</i> I	Klonierung
dN <sub>6</sub>	NNNNNN	mRNA	-	-	cDNA-Synthese
dT <sub>24</sub>	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	mRNA (A <sub>n</sub> )	-	-	cDNA-Synthese
EXFP_F-BamHI	AAAAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGA	<i>XFP</i>	-	<i>Bam</i> HI	Klonierung
EXFP_R-BamHI	AAAAAAGGATCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	<i>XFP</i>	-	<i>Bam</i> HI	Klonierung
EYFP_R_nost_BamHI	AAAGGATCCTCCCTTGTACAGCTCGTCCA	<i>XFP</i>	-	<i>Bam</i> HI	Klonierung
EYFP_Sall_F	AAAGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAG	<i>XFP</i>	-	<i>Sal</i> I	Klonierung
EYFP_Sall_R_STOP	AAAGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	<i>XFP</i>	-	<i>Sal</i> I	Klonierung
HvLCT2_EcoRI_nost	AAAAGAATTCTCCAAATATATCCAGGACCACTGCA	<i>HvLCT2</i>	AK355284	<i>Eco</i> RI	Klonierung
HvLCT2f_BamHI	AAAGGATCCATGGAACTGGAATGCAAAACCC	<i>HvLCT2</i>	AK355284	<i>Bam</i> HI	Klonierung
HvLCT2r_EcoRI_ST	AAAAAAGAATTCTCAAAATATATCCAGGACCACTGCA	<i>HvLCT2</i>	AK355284	<i>Eco</i> RI	Klonierung
LCT1_Xma1_F	AAAAAACCCGGGATGACGGCGCCGCCGCCT	<i>TaLCT1</i>	AF015523	<i>Xma</i> I / <i>Sma</i> I	Klonierung
LCT1_Xma1_R	AAAAAACCCGGGCTGGCTAACTGCCCTGGAGATCTCT	<i>TaLCT1</i>	AF015523	<i>Xma</i> I / <i>Sma</i> I	Klonierung
M13_for	GTAAAACGACGGCCAG	<i>pGEM®-T</i>	-	-	Sequenzierung
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>pGEM®-T</i>	-	-	Sequenzierung
mCherry_nost_r	TTTGATCCTCCCTTGTACAGCTCGTCCAT	<i>mCherry</i>	-	<i>Bam</i> HI	Klonierung

## Material und Methoden

Labor-interne Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Gen / Plasmid	ggf. Gennummer	Restriktions-schnittstelle	verwendet für
ocs-3'_R	ATGCGATCATAGGCGTCTCG	pART7	-	-	screening
pER8_f	CTTCGCAAGACCCTTCCTC	pER8	-	-	screening
pER8_r	TGTGGGCAATGAACTGATG	pER8	-	-	screening
pJR_F	GGTAGGTATTGATTGTAATTCTG	pJR1138	-	-	screening
pJR_R	GCGTAAAGGATGGGGAAAGAG	pJR1138	-	-	screening
pmUBI-MCS_f	AAAAAAGCGGCCGCACTAGTGGATCCCC	pUBI-AB	-	NotI	Klonierung
pmUBI-MCS_st_r	AAAAAATCTAGACTAGTCGACACGCGTAAGCT	pUBI-AB	-	XbaI	Klonierung
Pr35S_F1	TGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTA	pART7	-	-	screening
pUBI-AB_F	TTGATCTTGATATACTTGGATGATGG	pUBI-AB	-	-	screening
pUBI-AB_R	CCCATCTCATAAATAACGTCATGC	pUBI-AB	-	-	screening
pYES2_F	AAAACCCCGGATCGGACTAC	pYES2	-	-	screening
pYES2_R	ATAGGGACCTAGACTTCAGGTTGTC	pYES2	-	-	screening
ScGOS1p_f	AAACTCGAGATGAGCTCACAACCGTCTTTC	ScGOS1	YHL031C	XhoI	Klonierung
ScGOS1p_r	TCCCGGGTTACCATGTGAAAAACAAAAACA	ScGOS1	YHL031C	XmaI / SmaI	Klonierung
ScPEP12_f	AAAACTCGAGATGTGCGAAGACGAATTTTTTG	ScPEP12	YOR036W	XhoI	Klonierung
ScPEP12_r	TCCCGGGTTACAATTTTCATAATGAGAAAAATAAAAA	ScPEP12	YOR036W	XmaI / SmaI	Klonierung
ScSED5p_f	AAAACTCGAGATGAACATAAAGGATAGAACTTCAGA	ScSED5	YLR026C	XhoI	Klonierung
ScSED5p_r	TCCCGGGTTAATTGACTAAAACCCAAATAACG	ScSED5	YLR026C	XmaI / SmaI	Klonierung
ScTLG1p_f	AAAACTCGAGATGAACAACAGTGAAGATCCGT	ScTLG1	YDR468C	XhoI	Klonierung
ScTLG1p_r	TCCCGGGTCAAGCAATGAATGCCAAAAC	ScTLG1	YDR468C	XmaI / SmaI	Klonierung
TaLCT1_R_XmaI_STOP	AAAAAACCCGGGCTACTGGCTAACTGCCCTGGAGATCTCT	TaLCT1	AF015523	XmaI / SmaI	Klonierung
TaLCT1_RT_F	TCGCTGTGCTGTTTGGTTG	TaLCT1	AF015523	-	sqRT-PCR
TaLCT1_RT_R	GTGCCGCTGAAGAAGGTTG	TaLCT1	AF015523	-	sqRT-PCR
TaLCT1prmF3_SbfI	AACCTGCAGGCAAACAATTCAACATCTCTTCATAGAT	TaLCT1-Prom	AF015523	SbfI	Klonierung
TaLCT1promR_Hind	AAAAAGCTTCAAACGCCGTCGCCGA	TaLCT1-Prom	AF015523	HindIII	Klonierung

## 2.1.7. Bakterien

**Tabelle 2.1.6** Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Bezugsquelle	Selektion	Genotyp	verwendet für
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA	Streptomycin	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7 697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Plasmid-Amplifikation
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	Stratagene, San Diego, USA	Tetracyclin	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' proAB lacIqZ</i> Δ <i>M15 Tn10 Tetr</i>	Plasmid-Amplifikation
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	Peiter Lab., Halle, Deutschland	Gentamycin, Rifampicin	C58, pMP90	Tabak-Blattinfiltration; Transformation von <i>A. thaliana</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AGL-1	Dr. Jafargholi Imani, Universität Gießen, Deutschland	Carbenicillin, Rifampicin	C58, <i>recA::bla</i> , pTiBo542ΔT Mop <sup>+</sup> Cb <sup>R</sup>	Gerste-Transformation

## 2.1.8. Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*)

**Tabelle 2.1.7** Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Hefestämme

Stamm	relevante Mutationen	isogener Wildtyp	Referenz oder Bezugsquelle	Genotyp
W303-1A	keine (Wildtyp)	W303	Thomas & Rothstein, 1989	MATα; <i>leu2-3; 2-112; trp1-1; ura3-52; ade2-1; his3-11; can1-100; 15(j)</i>
BY4741	keine (Wildtyp)	BY4741	Euroscarf, Frankfurt, Deutschland (Acc. No. Y00000)	MATα; <i>his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0</i>
G19	<i>ena1-4Δ</i>	W303-1B	Quintero <i>et al.</i> , 1996	MATα; <i>leu2-3; 2-112; trp1-1; ura3-52; ade2-1; his3-11; can1-100; 15(j) ena1::HIS3::ena4</i>
AXT3	<i>ena1-4Δ nhx1Δ nha1Δ</i>	W303-1B	Quintero <i>et al.</i> , 2000	MATα; <i>ade2; his3; leu2; trp1; ura3; ena1::HIS3::ena4; nha1::LEU2; nhx1::TRP1</i>

## Material und Methoden

Stamm	relevante Mutationen	isogener Wildtyp	Referenz oder Bezugsquelle	Genotyp
CEN.SR 36-3C	<i>yvc1Δ</i>	CEN.PK	Euroscarf, Frankfurt, Deutschland (Acc. No. B0257A)	MATa; <i>ura3-52</i> ; <i>his3D1</i> ; <i>leu2-3_112</i> ; <i>trp1-289</i> ; <i>yvc1::HIS3</i>
BY4741-pmr1	<i>pmr1Δ</i>	BY4741	Euroscarf, Frankfurt, Deutschland (Acc. No. Y04534)	MATa; <i>his3D1</i> ; <i>leu2D0</i> ; <i>met15D0</i> ; <i>ura3D0</i> ; <i>pmr1::kanMX4</i>

### 2.1.9. Pflanzen

Tabelle 2.1.8 Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Pflanzen

Spezies	Ökotyp / Kultivar	Bezugsquelle	relevante Mutationen
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col-0)	Peiter Lab., Halle, Deutschland	keine (Wildtyp)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col-0)	Prof. Dr. Marcel Quint, Martin-Luther-Universität, Halle, Deutschland	<i>DR5::GUS</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col-0)	Prof. Dr. Ingo Heilmann, Martin-Luther-Universität, Halle, Deutschland	<i>PIN1<sub>Pro</sub>::PIN1-GFP</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col-0)	Prof. Dr. Ingo Heilmann, Martin-Luther-Universität, Halle, Deutschland	<i>PIN2<sub>Pro</sub>::PIN2-GFP</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia (Col-0)	Prof. Dr. Marc Knight, Durham University, Großbritannien	<i>35S::AEQ</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i>		Peiter Lab., Halle, Deutschland	keine (Wildtyp)
<i>Hordeum vulgare</i>	Golden Promise	Dr. Jafargholi Imani, Universität Gießen, Deutschland	keine (Wildtyp)
<i>Triticum aestivum</i>	Chinese Spring	Prof. Dr. Klaus Pillen, Martin-Luther-Universität, Halle, Deutschland	keine (Wildtyp)

## 2.1.10. Software & Datenbanken

**Tabelle 2.1.9** Übersicht über die in der Arbeit verwendete(n) Software und Datenbanken

Software / Datenbank	Referenz / Entwickler	WEB-Seite (Stand: November, 2016)
A Plasmid Editor (APE)	M. Wayne Davis	<a href="http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/">http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/</a>
AxioVision software (v4.8.2)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	<a href="http://www.zeiss.com/global/home.html">http://www.zeiss.com/global/home.html</a>
CerealsDB / Wheat Genomic Sequence	Brenchley <i>et al.</i> , 2012	<a href="http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/search_reads.php">http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/search_reads.php</a>
CorelDRAW (v11.633)	Corel Corporation, Ottawa, Kanada	<a href="http://www.corel.com/de/">http://www.corel.com/de/</a>
Free Pascal / Lazarus Project (v1.6)	Cliff Baeseman, Shane Miller, Michael A. Hess	<a href="http://www.lazarus-ide.org/">http://www.lazarus-ide.org/</a>
GNU Image Manipulation Program (GIMP) (v2.8.14)	Spencer Kimball & Peter Mattis	<a href="https://www.gimp.org/">https://www.gimp.org/</a>
GravProtractor (v1.3)	Ricardo Happeck im Rahmen der vorliegenden Arbeit	-
ImageJ (v1.48)	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>
National Center for Biotechnology Information - Basic Local Alignment Search Tool (NCBI / BLAST)	Zhang <i>et al.</i> , 2000	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Nikon EZ-C1 software	Nikon Corporation, Tokio, Japan	<a href="http://www.nikon.de/de_DE/">http://www.nikon.de/de_DE/</a>
Office 2003, 2007	Microsoft Corporation, Redmond, USA	<a href="https://www.microsoft.com/de-de/">https://www.microsoft.com/de-de/</a>
R-Studio (v0.98.501)	RStudio, Inc., Boston, USA	<a href="https://www.r-project.org/">https://www.r-project.org/</a> <a href="https://www.rstudio.com/">https://www.rstudio.com/</a>
Reference Manager (v11.0.1)	Thomson Reuters Corporation, New York, USA	<a href="http://referencemanager.com/">http://referencemanager.com/</a>
Saccharomyces Genome Database (SGD)	Cherry <i>et al.</i> , 2012	<a href="http://www.yeastgenome.org/">http://www.yeastgenome.org/</a>
Sequence Scanner Software v1.0	Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Waltham, USA	<a href="https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/applied-biosystems.html">https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/applied-biosystems.html</a>
SigmaPlot (v10.0)	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland	<a href="http://www.systat.de/">http://www.systat.de/</a>
The Arabidopsis Information Resource (TAIR)	Huala <i>et al.</i> , 2001	<a href="https://www.arabidopsis.org/">https://www.arabidopsis.org/</a>
TopPred v1.10	Claros & von Heijne, 1994	<a href="http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred">http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred</a>

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Für die Isolierung genomischer DNA zum Zweck der Identifikation (*screening*) gentechnisch veränderter Pflanzen mittels PCR (Kapitel 2.2.1.5) wurden circa 100 mg Blattmaterial in ein Reaktionsgefäß eingewogen und mithilfe eines Mikropistills in 400 µL DNA-Extraktionspuffer (s.u.) homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren des Zellmaterials wurden 300 µL des Überstandes mit dem gleichen Volumen 100%-igem Isopropanol gefällt. Die gefällte DNA wurde nun einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, anschließend für 30 bis 45 Minuten luftgetrocknet und in 50 µL mqH<sub>2</sub>O wieder gelöst. Die gelöste DNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

#### DNA-Extraktionspuffer

200 mM TRIS-HCl (pH 7,5)

250 mM Natriumchlorid

25 mM EDTA

5 g \* L<sup>-1</sup> SDS

- gelöst in mqH<sub>2</sub>O

#### 2.2.1.2. RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte mithilfe des *Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA Kits* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die am Ende in jeweils 50 µL sterilem mqH<sub>2</sub>O gelöste RNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.3. cDNA-Synthese

Für die Erststrangsynthese von cDNA (*complementary DNA*) wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die nach der in Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Methode isoliert wurde. Sollte die synthetisierte cDNA zur Amplifikation von Fragmenten dienen, die für weitere Klonierungsschritte verwendet wurden, wurde Reverse Transkriptase *SuperScript II* (Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA) und dT<sub>24</sub>-Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) eingesetzt. cDNA, die für quantitative Analysen (z.B. sqRT-PCR) verwendet wurde, wurde dagegen mit der Reversen Transkriptase *M-MuLV* (New England Biolabs (NEB), Ipswich, GB) und dN<sub>6</sub>-Oligonukleotiden (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) hergestellt. In beiden Fällen erfolgte die Synthese der cDNA nach den Angaben der jeweiligen Enzymhersteller.

### 2.2.1.4. Isolierung genomischer DNA aus Hefe

Genomische DNA wurde aus Hefe nach der von Harju *et al.*, 2004 beschriebenen Methode isoliert, mit dem Unterschied, dass flüssiger Stickstoff zum Schockgefrieren der Hefezellen genutzt wurde.

### 2.2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die *in vitro* Amplifikation gezielter DNA-Bereiche mithilfe spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 2.1.5) wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) eingesetzt (Mullis *et al.*, 1986). Sollte das erhaltene Amplikon, sprich das amplifizierte DNA-Endprodukt, für weitere Klonierungsschritte verwendet werden, wurden für die PCR-Reaktionen die DNA-Polymerasen *Phusion*<sup>®</sup> High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific (Finnzymes), Waltham, USA) oder *Q5*<sup>®</sup> High-Fidelity (New England Biolabs, Ipswich, GB) eingesetzt, da diese Enzyme über *ProofReading*-Aktivität verfügen, was wiederum die Wahrscheinlichkeit von Amplifikationsfehlern verringern sollte. Diente die PCR dagegen dem *Screening*, also der Identifikation von gentechnisch veränderten Pflanzen, Bakterien oder Hefen, wurde das Enzym *GoTaq*<sup>®</sup> DNA-Polymerase (Promega, Madison, USA) verwendet. Die einzelnen Reaktionsansätze für die unterschiedlichen PCR-Anwendungen sind in

Tabelle 2.2.1 dargestellt.

Die Amplifikation der DNA erfolgte im *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) oder im *TPersonal Thermocycler* (Biometra, Göttingen, Deutschland) nach folgendem allgemeinen Zyklusschema:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initialdenaturierung	95°C	300 sek
2. Denaturierung	95°C	30 sek
3. Annealing	55°C	30 sek
4. Elongation	72°C	x sek
→ Wiederholung der Schritte 2 bis 4 in 35 bis 40 Zyklen		
5. Finale Elongation	72°C	3 * x sek
6. Halteschritt	4°C	∞

Die für die Polymerisation der neu synthetisierten DNA-Stränge (Elongation) benötigte Zeit **x** war hierbei abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des Amplikons (in Kilobasenpaaren (kbp)). Bei Verwendung der *Phusion*<sup>®</sup> HF bzw. *Q5*<sup>®</sup> HF Polymerase erfolgte die Elongation für je 15 Sekunden pro kbp, bei Verwendung der *GoTaq*<sup>®</sup> Polymerase dagegen für je 60 Sekunden pro kbp des Amplikons.

## Material und Methoden

**Tabelle 2.2.1** Reaktionsansätze für die unterschiedlichen PCR-Anwendungen, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden.

	Amplifikation ausgehend von cDNA (für Klonierung)	Amplifikation ausgehend von Plasmid-DNA (für Klonierung)	Amplifikation ausgehend von gDNA (Screening)	Kolonie-PCR (Screening)
<b>Template</b>	5 µL cDNA	50-500 pg Plasmid-DNA in variablem Volumen	2 µL gDNA	Hefe- oder Bakterienkolonie mit sterilem Zahnstocher in der Lösung resuspendiert
<b>dNTPs</b> (je 10 mM)	1 µL	1 µL	0,5 µL	0,5 µL
<b>5' Oligonukleotid</b> (10 µM)	1 µL	1 µL	0,5 µL	0,5 µL
<b>3' Oligonukleotid</b> (10 µM)	1 µL	1 µL	0,5 µL	0,5 µL
<b>Puffer</b>	10 µL 5x <i>Phusion</i> <sup>®</sup> HF Buffer bzw. 10 µL 5x <i>Q5</i> <sup>®</sup> Reaction Buffer	10 µL 5x <i>Phusion</i> <sup>®</sup> HF Buffer bzw. 10 µL 5x <i>Q5</i> <sup>®</sup> Reaction Buffer	5 µL Colorless 5x <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> Reaction Buffer	5 µL Colorless 5x <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> Reaction Buffer
<b>DNA-Polymerase</b>	0,5 µL <i>Phusion</i> <sup>®</sup> HF (2 U * µL <sup>-1</sup> ) bzw. 0,5 µL <i>Q5</i> <sup>®</sup> HF (2 U * µL <sup>-1</sup> )	0,5 µL <i>Phusion</i> <sup>®</sup> HF (2 U * µL <sup>-1</sup> ) bzw. 0,5 µL <i>Q5</i> <sup>®</sup> HF (2 U * µL <sup>-1</sup> )	0,125 µL <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> (5 U * µL <sup>-1</sup> )	0,125 µL <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> (5 U * µL <sup>-1</sup> )
<b>mqH<sub>2</sub>O</b>	31,5 µL	ad. 50 µL	16,375 µL	18,375 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µL	50 µL	25 µL	25 µL

Das Ergebnis der PCR wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Aaij & Borst, 1972). Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde dem Gel der Farbstoff *SYBR*<sup>®</sup> *Safe - DNA Gel stain* (Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA) beigemischt (0,02 µL pro mL Gel). DNA-Fragmente, die für weitere Klonierungsschritte verwendet werden sollten, wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und über das *Wizard Gel Clean-Up and Purification System* (Promega, Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.2.1.6. Semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR (sqRT-PCR)

Zur Überprüfung der relativen *TaLCT1*-Expressionsstärke unterschiedlicher *XVE-TaLCT1*-transformierter Arabidopsis-Linien wurden Pflanzen zunächst, wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben, für 5 Tage vorkultiviert, bevor sie auf frische ½ MS-Agarplatten

## Material und Methoden

---

transferiert wurden, die 0,2  $\mu\text{M}$  Estradiol enthielten. Nach weiteren zwei Tagen unter den gleichen Wachstumsbedingungen wurden die Pflanzen mit einer sauberen Schere in Wurzel und Spross getrennt und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das gefrorene Pflanzenmaterial für die Isolation von Gesamt-RNA und anschließender cDNA-Synthese weiterverwendet (Kapitel 2.2.1.2 & 2.2.1.3). Um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA ausschließen zu können, wurden darüberhinaus Reaktionen angesetzt, in denen die cDNA-Synthese durch Weglassen der Reversen Transkriptase verhindert wurde. Je 5  $\mu\text{L}$  der Ansätze mit Reverser Transkriptase (+RT) und ohne Reverse Transkriptase (-RT) wurden anschließend für PCR-Reaktionen mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

● cDNA (+RT / -RT)	5 $\mu\text{L}$
● dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu\text{L}$
● 3' Oligonukleotid (10 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{L}$
● 5' Oligonukleotid (10 $\mu\text{M}$ )	0,5 $\mu\text{L}$
● Colorless 5x <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> Buffer	5 $\mu\text{L}$
● <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> Polymerase (5 U * $\mu\text{L}^{-1}$ )	0,125 $\mu\text{L}$
● mqH <sub>2</sub> O	ad. 25 $\mu\text{L}$

Für die *TaLCT1*-Amplifikation wurden die Oligonukleotide *TaLCT1\_RT\_F* und *TaLCT1\_RT\_R* verwendet (Sequenzen in Tabelle 2.1.5). Für die Amplifikation des *Housekeeping*-Gens *Polyubiquitin 10* (*AtUBQ10*; *At4G05320*) wurden dagegen die Oligonukleotide *At4g05320\_rt\_F* und *At4g05320\_rt\_R* eingesetzt.

Die PCR-Reaktion erfolgte im *TPersonal Thermocycler* (Biometra, Göttingen, Deutschland) nach folgendem Zykluschema:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initialdenaturierung	95°C	180 sek
2. Denaturierung	95°C	30 sek
3. Annealing	60°C	30 sek
4. Elongation	72°C	30 sek
→ Wiederholung der Schritte 2 bis 4 in 30 Zyklen		
5. Finale Elongation	72°C	180 sek
6. Halteschritt	4°C	$\infty$

Zur Auswertung wurden je 20  $\mu\text{L}$  der einzelnen Reaktionsansätze für die gelelektrophoretische Auftrennung eingesetzt.

### 2.2.1.7. Sequenzierung

Gezielte Abschnitte von Plasmid-DNA wurden mithilfe des *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Waltham, USA) sequenziert. Das verwendete System beruht auf dem Prinzip des Kettenabbruchs nach

Inkorporation von Dideoxynukleotiden (ddNTPs) während der Strangsynthese durch DNA-Polymerasen (Sanger *et al.*, 1977). Die ddNTPs sind im verwendeten *BigDye*<sup>®</sup> Kit mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, wodurch nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Proben eine automatisierte Fluoreszenz-Detektion ermöglicht wird.

Ein Ansatz für eine Sequenzier-Reaktion hatte folgende allgemeine Zusammensetzung:

- 2 µL 5x Puffer (400 mM TRIS-HCl (pH 9,0); 10 mM MgCl<sub>2</sub>)
- x µL (max. 5,5 µL) 200 ng Plasmid-DNA in variablem Volumen
- 2 µL Oligonukleotid (3,2 µM Endkonzentration)
- 0,5 µL *BigDye*<sup>®</sup> (enthält dNTPs, Fluoreszenzfarbstoff-markierte ddNTPs und DNA-Polymerasen)
- ad. 10 µL mqH<sub>2</sub>O

Die DNA wurde basierend auf der von Platt *et al.*, 2007 beschriebenen PCR-Methode in einem *TPersonal Thermocycler* (Biometra, Göttingen, Deutschland) amplifiziert. Anschließend wurde die amplifizierte DNA durch Zugabe von 1 µL 125 mM EDTA (pH 8,0), 1 µL 3 M Natriumacetat und 25 µL 100% Ethanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach 45 minütiger Zentrifugation (16.000 g; 4°C; Zentrifuge: 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und die DNA mit 60 µL 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min; 16.000 g; 4°C) wurde der Überstand wiederum abpipettiert und das verbleibende DNA-Pellet für 10 Minuten bei 80°C getrocknet. Die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der Fluoreszenzfarbstoff-markierten DNA-Proben wurden mithilfe der *Sequence Scanner Software v1.0* (Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Waltham, USA) ausgewertet.

### 2.2.1.8. TA-Klonierung

PCR-amplifizierte Vollängen-DNA-Fragmente von *TaLCT1* und *HvLCT2* wurden per TA-Klonierung zunächst in den Plasmidvektor *pGEM-T* (Promega, Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers kloniert. Die eingefügten DNA-Fragmente der Plasmide *pGEM-TaLCT1\_stop* und *pGEM-HvLCT2\_stop* wurden mithilfe der Oligonukleotide M13\_for und M13\_rev (Tabelle 2.1.5) sequenziert (Kapitel 2.2.1.7). Plasmide, die fehlerfreie Versionen der Gene enthielten, dienten im Anschluss als Ausgangspunkt für weitere Subklonierungsschritte (Tabelle 2.2.2).

### 2.2.1.9. Klonierung

#### 2.2.1.9.1. Spezifische DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Je 3 bis 5 µg isolierter Plasmid-DNA (Kpt. 2.2.1.12) bzw. PCR-Fragmente (Kpt. 2.2.1.5) wurden zur Generierung geeigneter 3'- und 5'-Enden mit Restriktionsendonukleasen, unter Verwendung der vom Hersteller (New England Biolabs, Ipswich, GB) empfohlenen Reaktionsbedingungen und Puffer, spezifisch hydrolysiert (= „verdaut“ bzw. „geschnitten“). Die im Einzelnen verwendeten Endonukleasen finden sich aufgelistet in Tabelle 2.2.2. Die Aufreinigung der „geschnittenen“ und mittels Agarosegelelektrophorese isolierten DNA-Fragmente erfolgte mithilfe des *Wizard Gel Clean-Up and Purification Systems* (Promega, Madison, USA).

#### 2.2.1.9.2. Generierung glatter DNA-Enden (*Blunting*)

Zur Herstellung glatter Enden (*blunt ends*) an DNA, die zuvor mit Endonukleasen „geschnitten“ wurde, die klebrige Enden (*sticky ends*) erzeugen, wurde das Klenow-Fragment (= DNA-Polymerase I) der Firma NEB benutzt. Ein typischer Reaktionsansatz hierfür hatte folgende Zusammensetzung:

- |   |                           |
|---|---------------------------|
| • „geschnittene“ DNA                        | 1 µg in variablem Volumen |
| • NEB-Puffer 2 (10x konzentriert)           | 4 µL                      |
| • Klenow-Fragment (5 U * µL <sup>-1</sup> ) | 0,2 µL                    |
| • dNTPs (10 mM)                             | 1 µL                      |
| • mqH <sub>2</sub> O                        | ad. 40 µL                 |

Die Ansätze wurden für jeweils 30 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend mithilfe des *Wizard Gel Clean-Up and Purification Systems* aufgereinigt.

#### 2.2.1.9.3. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um durch Entfernung von terminalen Phosphatgruppen die Religation von Plasmidvektoren zu verhindern, wurde „geschnittene“, linearisierte Plasmid-DNA unter Verwendung des Enzyms *Calf Intestinal alkaline Phosphatase* (CIP) der Firma NEB dephosphoryliert. Ein typischer Reaktionsansatz hierfür hatte folgende Zusammensetzung:

- |                                   |                           |
|-----------------------------------|---------------------------|
| • linearisierte Plasmid-DNA       | 1 µg in variablem Volumen |
| • NEB-Puffer 3 (10x konzentriert) | 4 µL                      |
| • CIP (10 U * µL <sup>-1</sup> )  | 1 µL                      |
| • mqH <sub>2</sub> O              | ad. 40 µL                 |

Die Ansätze wurden für jeweils 60 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend wiederum mithilfe des *Wizard Gel Clean-Up and Purification Systems* (Promega) aufgereinigt.

### **2.2.1.9.4. Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde das Enzym T4 DNA-Ligase von NEB verwendet. Ein allgemeiner Ligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

● linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA	100 ng in variablem Volumen
● „geschnittenes“ Insertionsfragment	Menge im Verhältnis 1:3 (Plasmid : Fragment)
● T4 Ligase Puffer (10x konzentriert)	1 µL
● T4 DNA-Ligase (400 CE U * µL <sup>-1</sup> )	0,5 µL
● mqH <sub>2</sub> O	ad. 10 µL

Die Ligation erfolgte für ca. 24 Stunden bei 16°C. Anschließend wurden je 2 µL der Ligationsansätze zur Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen verwendet (s.u.).

### **2.2.1.9.5. Klonierung der in der Arbeit verwendeten Plasmidvektoren**

In Tabelle 2.2.2 sind die individuellen Klonierungsschritte, die für die Generierung der verwendeten Plasmidvektoren notwendig waren, zusammengefasst. Für welche Versuche die fertigen Expressionsvektoren genutzt wurden, kann dagegen der Tabelle 2.1.4 entnommen werden.

## Material und Methoden

**Tabelle 2.2.2 Zusammenfassung der individuellen Klonierungsschritte zur Generierung der in der Arbeit verwendeten Plasmidvektoren.**

Ausgangs-Plasmid oder Template für Amplifikation mittels PCR	PCR-amplifiziert mit Oligonukleotiden (Sequenzen siehe Tabelle 2.1.5)	Verdau mit Restriktionsendonuklease	Blunting mit Klenow-Fragment	ligiert mit	fertiger Expressionsvektor, Zwischen-Plasmid oder Fragment
<i>pFGC_G-rb</i>	EXFP_F-BamH1 mCherry_nost_r	<i>Bam</i> HI	-	-	<i>mCherry_nost</i>
<i>pJR1138</i>	-	<i>Bam</i> HI	-	<i>mCherry_nost</i>	<i>pJR1138-mCherry_nost</i>
genomische Hefe-DNA (Wildtyp W303-1A)	ScTLG1p_f ScTLG1p_r	<i>Xma</i> I + <i>Xho</i> I	-	-	<i>ScTLG1_stop</i>
genomische Hefe-DNA (Wildtyp W303-1A)	ScSED5p_f ScSED5p_r	<i>Xma</i> I + <i>Xho</i> I	-	-	<i>ScSED5_stop</i>
genomische Hefe-DNA (Wildtyp W303-1A)	ScGOS1p_f ScGOS1p_r	<i>Xma</i> I + <i>Xho</i> I	-	-	<i>ScGOS1_stop</i>
genomische Hefe-DNA (Wildtyp W303-1A)	ScPEP12_f ScPEP12_r	<i>Xma</i> I + <i>Xho</i> I	-	-	<i>ScPEP12_stop</i>
<i>pJR1138-mCherry_nost</i>	-	<i>Xho</i> I + <i>Xma</i> I	-	<i>ScTLG1_stop</i>	<i>pJR1138-mCherry-ScTLG1</i>
<i>pJR1138-mCherry_nost</i>	-	<i>Xho</i> I + <i>Xma</i> I	-	<i>ScSED5_stop</i>	<i>pJR1138-mCherry-ScSED5</i>
<i>pJR1138-mCherry_nost</i>	-	<i>Xho</i> I + <i>Xma</i> I	-	<i>ScGOS1_stop</i>	<i>pJR1138-mCherry-ScGOS1</i>
<i>pJR1138-mCherry_nost</i>	-	<i>Xho</i> I + <i>Xma</i> I	-	<i>ScPEP12_stop</i>	<i>pJR1138-mCherry-ScPEP12</i>
<i>pART7</i>	-	<i>Bam</i> HI	-	<i>mCherry_nost</i>	<i>pART7-mCherry_nost</i>

## Material und Methoden

Ausgangs-Plasmid oder Template für Amplifikation mittels PCR	PCR-amplifiziert mit Oligonukleotiden	Verdau mit Restriktionsendonuklease	Blunting mit Klenow-Fragment	ligiert mit	fertiger Expressionsvektor, Zwischen-Plasmid oder Fragment
<i>A. thaliana</i> (Col-0) cDNA	AtSYP61_f AtSYP61_r	<i>Xba</i> I	-	-	<i>AtSYP61_stop</i>
<i>pART7-mCherry_nost</i>	-	<i>Xba</i> I	-	<i>AtSYP61_stop</i>	<i>pART7-mCherry-AtSYP61</i>
<i>pART7-mCherry-AtSYP61</i>	-	<i>Not</i> I	-	-	<i>35S::mCherry-AtSYP61-Tocs</i>
<i>pBART</i>	-	<i>Not</i> I	-	<i>35S::mCherry-AtSYP61-Tocs</i>	<i>pBART-mCherry-AtSYP61</i>
<i>pYES2-P<sub>ACT1</sub>::mt_pHLuorin</i>	-	<i>Bam</i> HI + <i>Eco</i> RI	ja	-	<i>pHLuorin_blunt</i>
<i>pJR1138</i>	-	<i>Bam</i> HI	ja	<i>pHLuorin_blunt</i>	<i>pJR1138-pHLuorin</i>
<i>pART7-EYFP</i>	EYFP_Sall_F EYFP_Sall_R_STOP	<i>Sal</i> I	-	-	<i>EYFP_stop</i>
<i>pART7-EYFP</i>	EXFP_F-BamHI EYFP_R_nost_BamHI	<i>Bam</i> HI	-	-	<i>EYFP_nost</i>
<i>pART7-EYFP</i>	-	<i>Not</i> I	-	-	<i>35S::EYFP-Tocs</i>
<i>pYES2-TaLCT1</i>	LCT1_Xma1_F TaLCT1_R_Xma1_STOP	-	-	<i>pGEM</i> ®-T mittels TA-Klonierung (Kpt. 2.2.1.8)	<i>pGEM-TaLCT1_stop</i>
<i>pYES2-TaLCT1</i>	LCT1_Xma1_F LCT1_Xma1_R	<i>Xma</i> I	-	-	<i>TaLCT1_nost</i>
<i>pGEM-TaLCT1_stop</i>	-	<i>Xma</i> I	-	-	<i>TaLCT1_stop</i>

## Material und Methoden

Ausgangs-Plasmid oder Template für Amplifikation mittels PCR	PCR-amplifiziert mit Oligonukleotiden	Verdau mit Restriktionsendonuklease	Blunting mit Klenow-Fragment	ligiert mit	fertiger Expressionsvektor, Zwischen-Plasmid oder Fragment
pART7	-	XmaI	-	TaLCT1_stop	pART7-TaLCT1
pART7-TaLCT1	-	NotI	-	-	35S::TaLCT1-Tocs
pBART	-	NotI	-	35S::TaLCT1-Tocs	pBART-TaLCT1
pBART	-	NotI	-	35S::EYFP-Tocs	pBART-EYFP
pART7-EYFP	-	XmaI	-	TaLCT1_nost	pART7-TaLCT1-EYFP
pUBI-AB	-	XmaI	-	TaLCT1_stop	pUBI-AB-TaLCT1_stop
pUBI-AB-TaLCT1_stop	pmUBI-MCS_f pmUBI-MCS_st_r	NotI + XbaI	-	-	pmUbi-MCS-TaLCT1_stop
pUBI-AB-TaLCT1_stop	-	SfiI	-	-	mUbi::TaLCT1-Tnos
pLH7000	-	SfiI	-	mUbi::TaLCT1-Tnos	pLH7000-TaLCT1
pYES2	-	NotI + XbaI	-	pmUbi-MCS-TaLCT1_stop	pYES2-pmUbi-MCS-TaLCT1_stop
pYES2-pmUbi-MCS-TaLCT1_stop	-	XmaI	-	TaLCT1 entfernt und Plasmid religiert	pYES2-pmUbi-MCS-TAG
pYES2-pmUbi-MCS-TAG	-	XmaI	-	TaLCT1_stop	pYES2-pmUbi-MCS-TaLCT1_stop-TAG
pYES2-pmUbi-MCS-TAG	-	XmaI	-	TaLCT1_nost	pYES2-pmUbi-MCS-TaLCT1_nost-TAG
pYES2-pmUbi-MCS-TaLCT1_stop-TAG	-	BamHI	-	EYFP_nost	pYES2-EYFP-TaLCT1

## Material und Methoden

Ausgangs-Plasmid oder Template für Amplifikation mittels PCR	PCR-amplifiziert mit Oligonukleotiden	Verdau mit Restriktionsendonuklease	Blunting mit Klenow-Fragment	ligiert mit	fertiger Expressionsvektor, Zwischen-Plasmid oder Fragment
<i>pYES2-pmUbi-MCS-TaLCT1_nost-TAG</i>	-	<i>Sall</i>	-	<i>EYFP_stop</i>	<i>pYES2-TaLCT1-EYFP</i>
<i>pART7-EYFP</i>	EXFP_F-BamH1 EXFP_R-BamH1	<i>BamHI</i>	ja	-	<i>EYFP_stop_blunt</i>
<i>pGEM-TaLCT1_stop</i>	-	<i>SmaI</i>	-	-	<i>TaLCT1_stop_blunt</i>
<i>pART7-TaLCT1-EYFP</i>	-	<i>EcoRI + XbaI</i>	ja	-	<i>TaLCT1-EYFP_blunt</i>
<i>pYES2-EYFP-TaLCT1</i>	-	<i>KpnI + XbaI</i>	ja	-	<i>EYFP-TaLCT1_blunt</i>
<i>pER8</i>	-	<i>AscI + PacI</i>	ja	<i>EYFP_stop_blunt</i>	<i>pER8-XVE-EYFP</i>
<i>pER8</i>	-	<i>AscI + PacI</i>	ja	<i>TaLCT1_stop_blunt</i>	<i>pER8-XVE-TaLCT1</i>
<i>pER8</i>	-	<i>AscI + PacI</i>	ja	<i>TaLCT1-EYFP_blunt</i>	<i>pER8-XVE-TaLCT1-EYFP</i>
<i>pER8</i>	-	<i>AscI + PacI</i>	ja	<i>EYFP-TaLCT1_blunt</i>	<i>pER8-XVE-EYFP-TaLCT1</i>
<i>pART7-TaLCT1-EYFP</i>	-	<i>NotI</i>	-		<i>35S::TaLCT1-EYFP-Tocs</i>
<i>pBART</i>	-	<i>NotI</i>	-	<i>35S::TaLCT1-EYFP-Tocs</i>	<i>pBART-TaLCT1-EYFP</i>
<i>pUBI-AB</i>	-	<i>Sall</i>	-	<i>EYFP_stop</i>	<i>pUBI-AB-EYFP</i>
<i>pUBI-AB-EYFP</i>	-	<i>XmaI</i>	-	<i>TaLCT1_nost</i>	<i>pUBI-AB-TaLCT1-EYFP</i>
<i>pYES2-TaLCT1-EYFP</i>	-	<i>XmaI</i>	-	TaLCT1 entfernt und Plasmid religiert	<i>pYES2-EYFP</i>

## Material und Methoden

Ausgangs-Plasmid oder Template für Amplifikation mittels PCR	PCR-amplifiziert mit Oligonukleotiden	Verdau mit Restriktions- endonuklease	Blunting mit Klenow- Fragment	ligiert mit	fertiger Expressionsvektor, Zwischen-Plasmid oder Fragment
Gerste (Golden Promise) cDNA	HvLCT2f_BamHI HvLCT2r_EcoRI_ST	-	-	pGEM®-T mittels TA-Klonierung (Kpt. 2.2.1.8)	pGEM-HvLCT2_stop
pGEM-HvLCT2_stop	-	BamHI + EcoRI	-	-	HvLCT2_stop
pYES2	-	BamHI + EcoRI	-	HvLCT2_stop	pYES2-HvLCT2
pGEM-HvLCT2_stop	HvLCT2f_BamHI HvLCT2_EcoRI_nost	BamHI + EcoRI	-	-	HvLCT2_nost
pUBI-AB-EYFP	-	BamHI + EcoRI	-	HvLCT2_nost	pUBI-AB-HvLCT2-EYFP
pYES2-pmUbi-MCS-TAG	-	BamHI + EcoRI	-	HvLCT2_nost	pYES2-pmUbi-MCS-HvLCT2(nost)-TAG
pYES2-pmUbi-MCS- HvLCT2(nost)-TAG	-	Sall	-	EYFP_stop	pYES2-HvLCT2-EYFP
HvLCT2_nost	-	-	ja	-	HvLCT2_nost_blunt
pART7-EYFP	-	SmaI	-	HvLCT2_nost_blunt	pART7-HvLCT2-EYFP
pART7-HvLCT2-EYFP	-	NotI	-	-	35S::HvLCT2-EYFP-Tocs
pBART	-	NotI	-	35S::HvLCT2-EYFP- Tocs	pBART-HvLCT2-EYFP

### 2.2.1.10. Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Zellen wurden zunächst 50 mL steriles LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht (~16 h) bei 37°C unter Schütteln (150 UPM) inkubiert. Fünfhundert Milliliter LB-Medium wurden mit 5 mL dieser Vorkultur inokuliert und wiederum unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur für 20 Minuten bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das zurückbleibende Zellpellet in 500 mL eiskaltem, sterilem mqH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach erneuter 20 minütiger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 250 mL eisgekühltem, sterilem 10% Glycerin resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in 2 mL eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und zu 60 µL Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

Elektrokompetente *A. tumefaciens* Zellen wurden auf die gleiche Weise hergestellt, mit dem Unterschied, dass YEB-Medien statt LB-Medien verwendet wurden. Außerdem wurden die Agrobakterien bei 28°C statt bei 37°C kultiviert.

### 2.2.1.11. Bakterientransformation

Die Bakterienzellen (je 60 µL pro Aliquot) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden anschließend 20 ng Plasmid-DNA (entspricht 2 µL Ligationsansatz) hinzugegeben und der Ansatz in gekühlte Elektroporationsküvetten (Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt. In einem Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden die Zellen nun einem Elektroschock von 2,5 kV ausgesetzt. Daraufhin wurden die Zellen umgehend in 500 µL SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde unter Schütteln bei 37°C (bzw. bei Agrobakterien 2 Stunden bei 28°C) wachsen gelassen. Je 50 und 500 µL der Bakteriensuspensionen wurden anschließend auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Agarplatten (für *E. coli*) bzw. YEB-Agarplatten (für Agrobakterien) mithilfe eines Drigalskispatels gleichmäßig ausplattiert. Die Agarplatten wurden daraufhin für 1 bis 2 Tage bei 37°C (*E. coli*) bzw. 28°C (Agrobakterien) inkubiert.

### 2.2.1.12. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mittels des *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification Kit* der Firma Promega (Madison, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 2.2.2. Transformationsmethoden

### 2.2.2.1. Hefe-Transformation

Zur Transformation von Hefe wurde die von Elble (1992) beschriebene Methode mit einigen Modifikationen verwendet. Hierzu wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Hefe von einer frisch bewachsenen Agarplatte entnommen und in 100  $\mu\text{L}$  Transformationspuffer (s.u.) resuspendiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{L}$  Lachsspermien-DNA ( $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) sowie 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (in maximal 10  $\mu\text{L}$ ) zugesetzt. Dann wurden 600  $\mu\text{L}$  PLATE-Puffer (s.u.) hinzupipettiert, gut gemischt und die so erhaltene Hefesuspension bei Raumtemperatur inkubiert (zwischendurch gelegentlich gemischt). Nach 4 bis 6 Stunden wurde die Suspension kurz zentrifugiert (13.000 UPM) und das Zellpellet in 500  $\mu\text{L}$  sterilem  $\text{mqH}_2\text{O}$  resuspendiert. Hiervon wurden nun 50 bis 100  $\mu\text{L}$  mit einem Drigalskispatel auf geeignete Selektionsmedien (in den meisten Fällen SC-Medium + Glucose) ausplattiert und für 3 bis 5 Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Erfolg der Transformation bei gewachsenen Hefekolonien wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (Kpt. 2.2.1.5).

#### Transformationspuffer

- |        |                   |
|--------|-------------------|
| 100 mM | Lithiumacetat     |
| 10 mM  | TRIS-HCl (pH 7,5) |
| 1 mM   | EDTA              |
- gelöst in  $\text{mqH}_2\text{O}$

#### PLATE-Puffer

- |                                    |                   |
|------------------------------------|-------------------|
| 100 mM                             | Lithiumacetat     |
| 10 mM                              | TRIS-HCl (pH 7,5) |
| 1 mM                               | EDTA              |
| 400 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | PEG 3350          |
- gelöst in  $\text{mqH}_2\text{O}$

### 2.2.2.2. Tabak-Blattinfiltration

Für die Genexpression in Tabak-Epidermiszellen wurden zunächst 20 mL steriles, mit entsprechenden Antibiotika versetztes YEB-Flüssigmedium mit einer transformierten *Agrobacterium tumefaciens*-Kolonie angeimpft und für 24 Stunden bei  $28^\circ\text{C}$  unter Schütteln (150 UPM) inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden am nächsten Tag in 50 mL Zentrifugationsröhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und 10 Minuten bei 5.000 g abzentrifugiert. Nach dem Abgießen der Überstände wurden die zurückbleibenden Bakterienpellets drei mal mit je 1 mL Infiltrationslösung (s.u.) gewaschen, um Antibiotikarückstände zu entfernen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets erneut in 1 mL Infiltrationslösung resuspendiert und die optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) photometrisch gemessen. Nun wurden die *A. tumefaciens*-Suspensionen mit Infiltrationslösung auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 eingestellt.

Sollten mehrere Gene co-exprimiert werden, wurden die entsprechenden Bakteriensuspensionen zu gleichen Verhältnissen gemischt. Danach wurde die Unterseite des Blattes einer 5 bis 6 Wochen alten Tabakpflanze mit einem sauberen Skalpell angeritzt (ohne das Blatt dabei zu durchzuschneiden) und die Agrobakterien-Suspensionen mit einer 1 mL Spritze ohne Kanüle vorsichtig injiziert. Die infiltrierten Gewebebereiche des Blattes wurden mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Die Tabakpflanzen wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei 23°C gehalten.

### Infiltrationslösung

5 g * L <sup>-1</sup>	D(+) Glucose
2 mM	Magnesiumchlorid
50 mM	MES-KOH (pH 5,8)
• gelöst in mqH <sub>2</sub> O	
0,1 mM	Acetosyringon (→ 100 µL * L <sup>-1</sup> Stammlösung (1 M Acetosyringon gelöst in DMSO))

### **2.2.2.3. Protoplastentransformation (Gerste & Weizen)**

Für die transiente Genexpression in Weizen- bzw. Gerste-Protoplasten wurde eine von Abel & Theologis, 1994 beschriebene Methode zur Transformation von Arabidopsis-Protoplasten mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

Die verwendeten Pflanzen wurden unter den folgenden Bedingungen angezogen:

Samenquellung:	6 Stunden in 1 mM CaSO <sub>4</sub> -Lösung
Keimung:	4 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur auf Filterpapier
Wachstum:	3-6 Tage im Pflanzenklimaschrank (AR75, Percival Scientific, Perry, USA)
Photoperiode:	Tag: 16 Stunden Licht (150 µmol * m <sup>-2</sup> * s <sup>-1</sup> ) Nacht: 8 Stunden Dunkelheit
Temperatur:	Tag: 22°C / Nacht: 18°C
relative Luftfeuchte:	ganztäglich 65%

Zunächst wurden Blätter in Plasmolysepuffer (s.u.) überführt, mit einer Rasierklinge in ~0,5 mm breite Streifen geschnitten und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke in Protoplastierlösung (s.u.) überführt und für 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die isolierten Protoplasten wurden zweimal mit W5-Lösung (s.u.) gewaschen. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt und mit MaMg-Lösung (s.u.) auf eine Dichte von 2 \* 10<sup>6</sup> Zellen pro mL eingestellt. 10 bis 20 µg Plasmid-DNA (gelöst in einem Volumen von 10 µL) wurden zu 100 µL Zellsuspension pipettiert, mit 110 µL PEG-CMS Lösung (s.u.) gemischt und für 20 Minuten bei 23°C inkubiert. Anschließend wurde 1 mL W5-Lösung hinzupipettiert und die Suspension für 2 Minuten bei 100 g abzentrifugiert. Die transformierten Protoplasten wurden schließlich in 750 µL Protoplasten-Inkubationslösung (s.u.) resuspendiert und für 18 Stunden bei 23°C im Dunkeln

## Material und Methoden

---

inkubiert. Da diese Methode zur Expression von Genen für fluoreszierende Proteine genutzt wurde, konnte der Erfolg der Transformation mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden.

### Plasmolysepuffer

- |        |                  |
|--------|------------------|
| 15 mM  | MES-KOH (pH 5,7) |
| 1 mM   | Calciumchlorid   |
| 750 mM | Mannitol         |
- gelöst in mqH<sub>2</sub>O

### Protoplastierungslösung

- |        |                        |
|--------|------------------------|
| 1,5%   | Cellulase (Onozuka RS) |
| 0,75%  | Macerase (R10)         |
| 0,2%   | Hemicellulase (H2125)  |
| 600 mM | D-Mannitol             |
| 10 mM  | MES-KOH (pH 5,7)       |
- Zugabe von mqH<sub>2</sub>O (1/5-tel des Endvolumens)
  - 10 Minuten bei 55°C inkubieren, um die Enzyme zu lösen
  - Rückkühlung auf Raumtemperatur
- |      |                          |
|------|--------------------------|
| 1 mM | Calciumchlorid           |
| 0,1% | Rinderserumalbumin (BSA) |
| 5 mM | β-Mercaptoethanol        |
- Zugabe von mqH<sub>2</sub>O bis zum Erreichen des Endvolumens
  - Filtration durch Membranfilter (0,2 µm Porengröße) (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

### W5-Lösung (modifiziert nach Menczel *et al.*, 1981)

- |        |                  |
|--------|------------------|
| 125 mM | Calciumchlorid   |
| 154 mM | Natriumchlorid   |
| 5 mM   | Kaliumchlorid    |
| 2 mM   | MES-KOH (pH 5,7) |
- gelöst in mqH<sub>2</sub>O

### MaMg-Lösung

- |        |                  |
|--------|------------------|
| 600 mM | D-Mannitol       |
| 15 mM  | Magnesiumchlorid |
| 4 mM   | MES-KOH (pH 5,7) |
- gelöst in mqH<sub>2</sub>O

### PEG-CMS Lösung

- |          |                        |
|----------|------------------------|
| 1 g      | Polyethylenglycol 4000 |
| 0,375 mL | mqH <sub>2</sub> O     |
| 1 mL     | D-Mannitol (1 M)       |
| 0,25 mL  | Calciumnitrat (1 M)    |

### Protoplasten-Inkubationslösung

600 mM	D-Mannitol
4 mM	MES-KOH (pH 5,7)
4 mM	Kaliumchlorid
100 µg*mL <sup>-1</sup>	Ampicillin

- gelöst in mqH<sub>2</sub>O

- Filtration durch Membranfilter (0,2 µm Porengröße) (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

### **2.2.2.4. Gerste-Transformation**

Die Transformation von Gerste mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte in Anlehnung an die von Tingay *et al.*, 1997 beschriebene Methode. Da an der Originalmethode mehrere Modifikationen vorgenommen wurden, werden die wesentlichen Schritte im folgenden aufgeführt.

Für die Transformation wurden Gerstepflanzen des Kultivars Golden Promise unter folgenden Bedingungen in einer Klimakammer angezogen:

Photoperiode:	Tag: 16 Stunden Licht (600 - 700 µmol * m <sup>-2</sup> * s <sup>-1</sup> ) Nacht: 8 Stunden Dunkelheit
Temperatur:	Tag: 18°C / Nacht: 14°C
relative Luftfeuchte:	ganztäglich 60 - 70%

Die Ähren wurden geerntet, wenn die unreifen Embryonen eine Größe zwischen 1,5 bis 2,5 mm hatten (ca. 14 Tage nach Ende der Blüte). Nach Entfernung der Grannen wurden die mittleren Körner der Ähren isoliert und für eine Minute in 70% Ethanol und 20 Minuten in Hypochloritlösung (3% NaClO + 1 Tropfen Tween 20) sterilisiert. Nach Abgießen der Lösung wurde mit sterilem mqH<sub>2</sub>O (pH 3,0 mit HCl eingestellt) neutralisiert und weitere zwei- bis dreimal mit sterilem mqH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Körner bis zur Präparation der Embryonen auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurde der Embryo mithilfe eines Skalpells und einer Lanzette vom Endosperm getrennt. Nach Entfernung der Blatt- und Wurzelanlagen wurden die Embryonen mit der Scutellum-Seite nach oben auf Kallus-Induktionsmedium (C-) platziert (Tabelle 2.2.3).

Pro Agarplatte wurden jeweils 25 präparierte Embryonen mit 200 µL entsprechender Agrobakterien-Suspension (OD<sub>600</sub> = 1 - 2 in YEB-Medium) beimpft. Nach weiteren 40 Minuten wurden die Embryonen auf neue Kallus-Induktionsmedien (C-) überführt und im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Embryonen auf neue Antibiotika-haltige Kallus-Induktionsmedien (C+; Tabelle 2.2.3) überführt und wiederum im Dunkeln bei 24°C inkubiert. Je drei mal, jeweils im Abstand von zwei Wochen, wurden die proliferierenden Kalli auf neue C+ Medien umgesetzt. Während erfolgreich transformiertes Kallusgewebe auf den Antibiotika-haltigen Medien wachsen konnte, starben nicht transformierte Zellen ab. Zur Induktion des

## Material und Methoden

Sprosswachstums wurden nach 6 Wochen die Kalli unter sterilen Bedingungen auf Spross-Induktionsmedium (Tabelle 2.2.3) überführt und unter folgenden Wachstumsbedingungen in einem Gewebekulturschrank (A1000, Conviron, Winnipeg, Kanada) kultiviert:

Photoperiode: Tag: 16 Stunden Licht ( $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 Nacht: 8 Stunden Dunkelheit  
 Temperatur: Tag: 22°C / Nacht: 18°C  
 relative Luftfeuchte: ganztägig 65%

Kalli, die nach zwei bis drei Wochen kleine, grüne Blätter gebildet hatten, wurden zur Induktion des Wurzelwachstums unter sterilen Bedingungen auf Antibiotika-haltiges Wurzel-Induktionsmedium (Tabelle 2.2.3) umgesetzt und unter den obigen Bedingungen weiter kultiviert. Nach weiteren drei bis vier Wochen wurden Kalli, die nun Blätter und Wurzeln gebildet hatten, vorsichtig auf Erde transferiert und unter Gewächshausbedingungen bis zur Samenreife weiter wachsen gelassen.

**Tabelle 2.2.3** Verwendete Kulturmedien für die Transformation von Gersteembryonen

	<b>Kallus-Induktionsmedium (C-)</b>	<b>Kallus-Induktionsmedium (C+)</b>	<b>Spross-Induktionsmedium</b>	<b>Wurzel-Induktionsmedium</b>
<i>Murashige &amp; Skoog</i> Mixtur	4,3 g * L <sup>-1</sup> MS (BSM)	4,3 g * L <sup>-1</sup> MS (BSM)	2,7 g * L <sup>-1</sup> MS-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2,7 g * L <sup>-1</sup> MS-NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
Kupfersulfat	5 μM	5 μM	5 μM	2,5 μM
D(+) Maltose Monohydrat	30 g * L <sup>-1</sup>	30 g * L <sup>-1</sup>	20 g * L <sup>-1</sup>	20 g * L <sup>-1</sup>
Thiamin-HCl	1 mg * L <sup>-1</sup>	1 mg * L <sup>-1</sup>	0,4 mg * L <sup>-1</sup>	0,4 mg * L <sup>-1</sup>
<i>myo</i> -Inositol	250 mg * L <sup>-1</sup>	250 mg * L <sup>-1</sup>	100 mg * L <sup>-1</sup>	125 mg * L <sup>-1</sup>
Caseinhydrolysat	1 g * L <sup>-1</sup>	1 g * L <sup>-1</sup>	-	0,5 g * L <sup>-1</sup>
L-Prolin	690 mg * L <sup>-1</sup>	690 mg * L <sup>-1</sup>	-	345 mg * L <sup>-1</sup>
Dicamba	2,5 mg * L <sup>-1</sup>	2,5 mg * L <sup>-1</sup>	-	-
Ammoniumnitrat	-	-	165 mg * L <sup>-1</sup>	165 mg * L <sup>-1</sup>
L-Glutamin	-	-	750 mg * L <sup>-1</sup>	750 mg * L <sup>-1</sup>
2,4-D	-	-	2,5 mg * L <sup>-1</sup>	-
BAP	-	-	0,1 mg * L <sup>-1</sup>	-
pH-Wert	5,9	5,9	5,6	5,9
Phyto-Agar	6 g * L <sup>-1</sup>	6 g * L <sup>-1</sup>	6 g * L <sup>-1</sup>	6 g * L <sup>-1</sup>
Ticarcillin + Clavulanate K	-	150 μg * mL <sup>-1</sup>	150 μg * mL <sup>-1</sup>	150 μg * mL <sup>-1</sup>
Hygromycin B bei binärem Vektor <i>pLH6000</i>	-	50 μg * L <sup>-1</sup>	50 μg * L <sup>-1</sup>	50 μg * L <sup>-1</sup>
Bialaphos bei binärem Vektor <i>pLH7000</i>	-	5 mg * L <sup>-1</sup>	2,5 mg * L <sup>-1</sup>	2,5 mg * L <sup>-1</sup>

### 2.2.2.5. Arabidopsis-Transformation

Die Transformation von 5 bis 6 Wochen alten, unter Gewächshausbedingungen gewachsenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Ökotyp: Col-0) wurde nach der *Floral-Dip* Methode durchgeführt (Clough & Bent, 1998). Von den Pflanzen wurden nach etwa drei Wochen im Gewächshaus erste Blütenstände entfernt, um die verstärkte Bildung weiterer Infloreszenzen zu provozieren. Am Tag der Transformation wurden Schoten und bereits geöffnete Blüten mit einer Schere von den Pflanzen entfernt.

Eine mittels PCR getestete *Agrobacterium tumefaciens*-Kolonie, die die gewünschten Genkonstrukte trug, wurde von einer YEB-Selektionsplatte in 50 µL sterilem Wasser resuspendiert. Die so hergestellte Bakteriensuspension wurde wiederum auf eine neue YEB-Selektionsplatte ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C inkubiert. Von der dicht bewachsenen Platte wurden die Bakterien mit einem Laborspatel abgenommen und in 20 mL YEB-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3,0 resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend zu weiteren 300 mL Wasser (mit 5% Saccharose und 0,03% Silwet L77) gegeben. Die vorbereiteten Arabidopsis-Pflanzen wurden nun für 30 bis 60 Sekunden in die Bakteriensuspension getaucht. Daraufhin wurden die Pflanzen für weitere 4 bis 6 Wochen bis zur Samenreife im Gewächshaus kultiviert.

Samen transformierter Pflanzen wurden geerntet und auf Hygromycin B-haltigen Selektionsplatten (½ MS-Agarplatten (0,8% Phytoagar) + 20 µg \* mL<sup>-1</sup> Hygromycin B) ausgesät. Nach 7 bis 10 Tagen waren untransformierte Keimlinge abgestorben. Die überlebenden Keimlinge wurden vorsichtig auf Erde umgesetzt. Nach weiteren 2 bis 3 Wochen Wachstum im Gewächshaus wurde Blattmaterial von den Pflanzen entnommen, DNA isoliert und in einer anschließenden PCR der Erfolg der Transformation überprüft. Erfolgreich transformierte Pflanzen wurden für die Vermehrung weitergeführt, nicht transformierte wurden verworfen.

### 2.2.3. Heferversuche

#### 2.2.3.1. Wachstumsversuche (*Drop-Assays*)

Für Wachstumsversuche wurden mit *pYES2*, *pYES2-TaLCT1* oder *pYES2-HvLCT2* transformierte Hefestämme entweder aus einem Kryostock (25% Glycerin) oder direkt von einer Selektionsplatte zum Animpfen einer 3 mL Starterkultur benutzt. Je nach Versuch wurde entweder flüssiges SC- oder AP-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle gewählt. Die Starterkultur wurde über Nacht bei 150 - 180 UPM und 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte der Kultur mithilfe einer *Improved Neubauer* Zählkammer ermittelt und die Zellzahl berechnet, welche benötigt wird, damit die Zellkultur nach weiteren 6 bis 8 Stunden eine Dichte von 1 \* 10<sup>7</sup> Zellen pro mL erreicht. Das entsprechende Volumen der Starterkultur wurde zum Animpfen der Hauptkultur (5 mL) verwendet. Die Hauptkultur bestand in der Regel aus dem

gleichen Medium wie die Starterkultur, mit dem Unterschied, dass Galaktose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde. Die Galaktose bewirkt in den Hefen die Induktion des auf dem *pYES2*-Plasmid inklonierten Gens durch den *GAL1*-Promoter dieses Plasmids.

Nach einer weiteren 6 bis 8 stündigen Inkubation (30°C, 150 - 180 UPM) wurde erneut die Zelldichte der Kultur bestimmt und diese mit sterilem mqH<sub>2</sub>O auf exakt  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro mL verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden anschließend 3 weitere Verdünnungen mit mqH<sub>2</sub>O hergestellt (1:10; 1:100; 1:1000). Für die Wachstumsversuche wurden von jeder der vier Zellverdünnungen je 10 µL auf entsprechende Selektionsagarplatten (+ Galaktose) pipettiert. Sollte die Auswirkung bestimmter Substanzen auf das Hefewachstum getestet werden, wurden diese zuvor in den angegebenen Konzentrationen zu den noch flüssigen Agarmedien gegeben. Die Platten wurden anschließend zum Schutz vor Austrocknung mit Parafilm<sup>®</sup>M (VWR, Radnor, USA), versiegelt und für 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Dokumentation wurden sie dann mit einem Perfection V750 Pro Flachbett-Scanner (Epson, Japan) eingescannt.

### 2.2.3.2. Calciummessungen in Hefe

Für luminometrische Calciummessungen wurden Hefen des Stammes CEN.SR36-3C (*yvc1Δ*) doppelt transformiert. Im ersten Schritt wurden Hefen mit dem Plasmid *pEVP11-AEQ* transformiert, welches ein Gen für das Calciumreporterprotein APOAEQUORIN trägt (Batiza *et al.*, 1996), das in der Hefe konstitutiv exprimiert wird. Erfolgreich transformierte Hefen wurden mittels Leucin-freiem SC-Medium selektiert. Diese Hefen wurden in einem weiteren Schritt entweder mit dem leeren *pYES2*-Vektor (Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA) oder *pYES2-TaLCT1* (Quelle: Anna Amtmann) transformiert. Hefen, die sowohl *pEVP11-AEQ* als auch einen der beiden *pYES2*-Vektoren trugen, wurden mittels Glucose-haltigen SC-Kulturmedien selektiert, die weder Urazil noch Leucin enthielten. Daraufhin wurden 5 mL SC-Medium (-LEU -URA) mit einer Starterkultur so angeimpft, dass die Kultur bei Wachstum über Nacht (30°C, 150 - 180 UPM), am nächsten Morgen eine Dichte von  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro mL aufwies. Je nachdem, ob der Einfluss von exogenem Calcium getestet werden sollte oder nicht wurde entweder Calcium-haltiges (0,2 mM CaCl<sub>2</sub>) oder Calcium-freies SC-Medium verwendet. Zur Rekonstitution des APOAEQUORINs zum aktiven AEQUORIN wurden dem Kulturmedium 1 µM Coelenterazin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Als Kohlenstoffquelle diente Galaktose, um die Expression von *TaLCT1* über den *GAL1*-Promoter auf dem *pYES2*-Plasmid zu induzieren. Von diesen Zellsuspensionen wurden je 200 µL in Luminometerröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte in einem Sirius-1 Röhrchenluminometer (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland).

Für die Analyse der Reaktion auf Salzstress wurde mittels einer Spritze 200  $\mu\text{L}$  SC-Medium mit 2 M Natriumchlorid zur im Luminometer befindlichen Hefesuspension appliziert, was einer Endkonzentration von 1 M entsprach. Um den Effekt von exogenem Calcium zu überprüfen, wurde zu den in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Medium kultivierten Hefen 200  $\mu\text{L}$  einer Lösung mit 2 M Natriumchlorid, 50 mM MES-KOH pH 7,0 und 25 mM EGTA appliziert. Zur Bestimmung der Gesamtlumineszenz wurde zu den Hefen 400  $\mu\text{L}$  *Discharging*-Lösung injiziert (2 M Calciumchlorid in 20% Ethanol). Die cytosolischen Calciumkonzentrationen wurden aus den Rohdaten nach dem von Allen *et al.*, 1977 beschriebenen Verfahren berechnet.

### 2.2.3.3. Messung des cytosolischen pH-Werts in Hefe

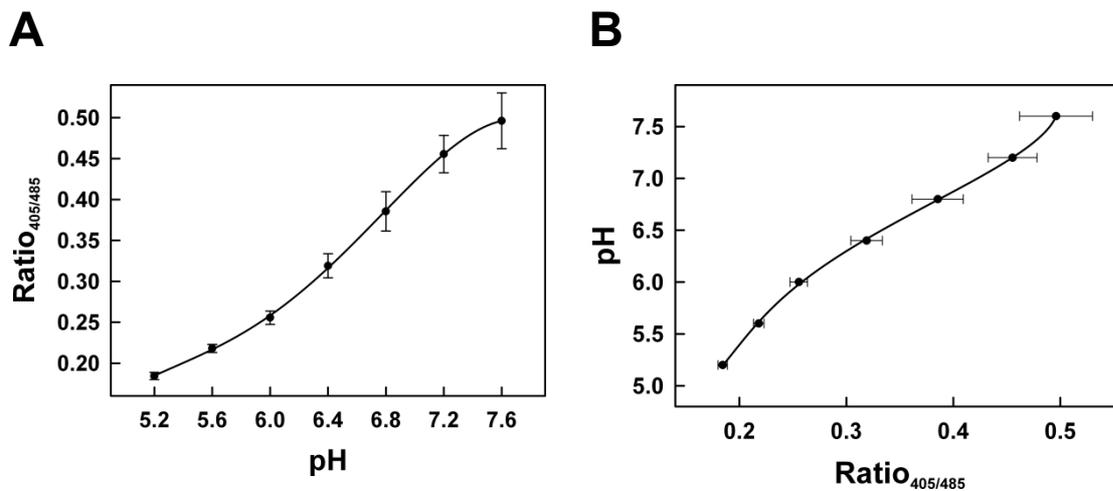
Zunächst wurden Hefen, die bereits mit den Vektoren *pYES2* bzw. *pYES2-TaLCT1* transformiert waren, mit dem Plasmid *pJR1138-pHLuorin* transformiert. Dieses Konstrukt trägt das Gen für das pH-sensitive GFP-Derivat pHLuorin (Miesenböck *et al.*, 1998; Orij *et al.*, 2009), welches von den Zellen konstitutiv exprimiert wird. Hefen, die beide Plasmide trugen, konnten über Leucin- und Urazil-freie Kulturmedien selektiert werden.

Am Abend vor der Messung wurden 15 mL SC-Medium mit Galaktose in sterilen Erlenmeyerkolben mit einer Starterkultur so angeimpft, dass am nächsten Morgen die Dichte der Kultur  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro mL betrug. Zur Kalibrierung der pH-Messungen wurden die Hefesuspensionen für 15 Minuten in PBS (+100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Digitonin) inkubiert, zweimal mit PBS (ohne Digitonin) gewaschen und in Citrat/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Puffern (s.u.) mit verschiedenen pH-Werten (von pH 5,2 bis 7,6) auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 resuspendiert. Durch die Behandlung der Zellen mit Digitonin wurden die Zellmembranen porös, wodurch bei der anschließenden Inkubation in den Citrat/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffern das Cytosol der Zellen den gleichen pH-Wert annahm wie der jeweilige Puffer.

Zur pH-Messung wurden je 200  $\mu\text{L}$  Zellsuspension in weiße 96-Loch Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Die ratiometrische Messung im Mithras LB 940 Mikrotiterplatten-Lesegerät (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) erfolgte bei den Anregungswellenlängen 405 und 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Parallel zu den mit *pHLuorin*-transformierten Hefen wurden auch Hefen gemessen, die kein *pHLuorin* exprimierten. Dies diente der Bestimmung der Hefe-Eigenfluoreszenz, die von den gemessenen Werten subtrahiert wurde. Anschließend wurden die Werte der gemessenen Emission bei Anregung mit 405 nm durch die gemessene Emission bei Anregung mit 485 nm geteilt. Die so erhaltenen Werte ( $\text{Ratio}_{405/485}$ ) wurden in einem Diagramm gegen die pH-Werte der jeweiligen Puffer aufgetragen (Abb. 2.1). Die Bestimmung der Umkehrfunktion der resultierenden Kalibrierungskurve diente

schließlich in den weiteren Versuchen der Berechnung der cytosolischen pH-Werte anhand der gemessenen Fluoreszenzverhältnisse.

Für die eigentlichen pH-Wertmessungen wurden die Hefesuspensionen abzentrifugiert, das resultierende Zellpellet zwei- bis dreimal mit APLF-Medium gewaschen und in 15 mL des Mediums resuspendiert. Das APLF-Medium (Arginin-Phosphat / Low Fluorescence) entspricht in seiner Zusammensetzung dem normalen AP-Medium (Kapitel 2.1.4), enthält jedoch kein Riboflavin und keine Folsäure, da die Autofluoreszenz dieser Substanzen die anschließenden Messungen stören würden.



**Abbildung 2.1. Kalibrierung für Messungen des pH<sub>cyt</sub> in Hefen.**

Die Kalibrierung für die Messungen des cytosolischen pH-Werts wurde mit permeabilisierten *pHLuorin*-exprimierenden Hefen vorgenommen, die in Citrat/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffern verschiedener pH-Werte inkubiert wurden. **(A)** Die aus dem Emissionsverhältnis der Anregung bei 405 nm und 485 nm resultierende Funktion der Kalibrierungskurve wurde mit dem Programm *Microsoft EXCEL* bestimmt. **(B)** Die hieraus ermittelte Umkehrfunktion diente in weiteren Versuchen der Berechnung des pH-Werts aus den gemessenen Fluoreszenzwerten. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) von je 4 Messungen.

Je 200  $\mu$ L der Zellen wurden in 96-Lochplatten pipettiert und gemessen. Sollte im Versuch der Effekt von Natriumchlorid auf den cytosolischen pH-Wert getestet werden, wurden 50  $\mu$ L einer fünffach konzentrierten Lösung in APLF-Medium zu den Hefekulturen injiziert.

### Citratlösung

100 mM                      Zitronensäure

### Phosphatlösung

35,62 g \* L<sup>-1</sup>                      Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat

### Citrat/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer (nach McIlvaine, 1921)

pH 5,2	46,40 mL Citratlösung + 53,60 mL Phosphatlösung
pH 5,6	42,00 mL Citratlösung + 58,00 mL Phosphatlösung
pH 6,0	36,85 mL Citratlösung + 63,15 mL Phosphatlösung

pH 6,4	30,75 mL Citratlösung + 69,25 mL Phosphatlösung
pH 6,8	22,75 mL Citratlösung + 77,25 mL Phosphatlösung
pH 7,2	13,05 mL Citratlösung + 86,95 mL Phosphatlösung
pH 7,6	6,35 mL Citratlösung + 93,65 mL Phosphatlösung

- pH überprüfen und ggf. nachtitrieren

### 2.2.4. Pflanzenversuche

#### 2.2.4.1. Anzucht von *A. thaliana* auf Agarplatten

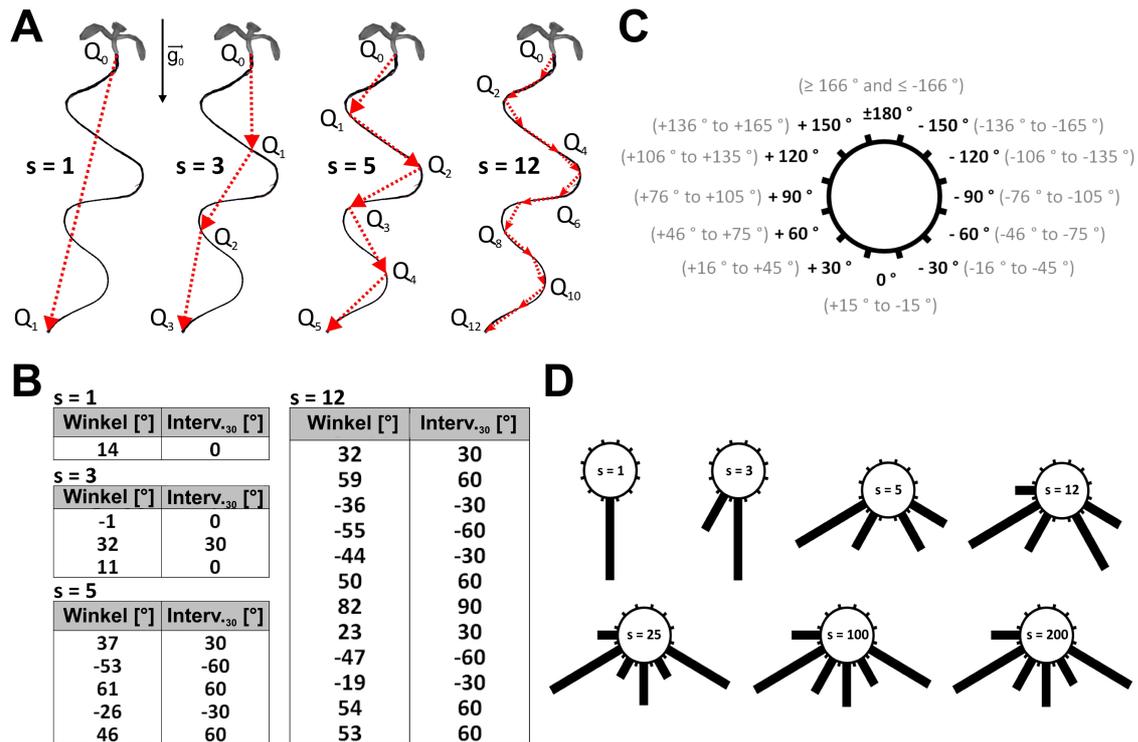
Für die Anzucht auf Agarplatten wurden die Oberflächen von Arabidopsis-Samen für eine Minute mit 70% Ethanol und 5 Minuten mit Hypochloritlösung (4% NaClO; 0,02% Triton X-100) sterilisiert, gefolgt von 3 bis 4 Waschschritten mit sterilem  $\text{mqH}_2\text{O}$ . Als nächstes wurden die Samen auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten (Kpt. 2.1.4) ausgesät und für 2 Tage bei 4 bis 8°C im Dunkeln stratifiziert. Für Keimung und Wachstum der Pflanzen wurden die Platten anschließend vertikal in einen Pflanzenklimaschrank (AR75, Percival Scientific, Perry, USA) mit den folgenden Langtag-Wachstumsbedingungen gestellt:

Photoperiode:	Tag: 16 Stunden Licht ( $100 - 150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )
	Nacht: 8 Stunden Dunkelheit
Temperatur:	Tag: 22°C / Nacht: 18°C
relative Luftfeuchte:	ganztäglich 65%

#### 2.2.4.2. Quantifizierung des Wurzelgravitropismus

Für die Beschreibung des gravitropischen Wurzelwachstums von Arabidopsis-Pflanzen mithilfe von Richtungsdiagrammen wurden die digitalisierten Wurzeln in gleichgroße Segmente aufgeteilt. Anschließend wurde für jedes einzelne Segment der individuelle Wachstumswinkel im Vergleich zum Gravitationsvektor ermittelt (Abbildung 2.2.A). Die so erhaltenen Wachstumswinkel wurden in Gruppen von 30° Intervallen eingeteilt, die wiederum zur Darstellung des proportionalen Anteils einer bestimmten Wachstumsrichtung im Verhältnis zu anderen Wachstumsrichtungen in Richtungsdiagrammen dienen (Abbildung 2.2.B bis C). Für diese Analysen wurde das Programm *GravProtractor* (v1.3) mithilfe der quelloffenen Entwicklungsumgebung *Free Pascal / Lazarus Project* (v1.6) erstellt. Eine detaillierte Anleitung für das Programm *GravProtractor* in englischer Sprache ist im Anhang zu finden (Kpt. 8.1).

Zur statistischen Analyse des Gravitropismus dagegen wurde das Wurzelwachstum nach der von Grabov (2005) beschriebenen Methode quantifiziert. Hierbei wird zur Berechnung des vertikalen Wachstumsindex (*vertical growth index*; VGI) der Quotient aus Höhe des Wurzelwachstums ( $L_y$ ) und Wurzellänge (L) gebildet (Grabov *et al.*, 2005).



**Abbildung 2.2. Beschreibung des gerichteten Wurzelwachstums mithilfe von Richtungsdiagrammen.**

(A) Durch die Einteilung einer digitalisierten Pflanzenwurzel in gleichgroße Segmente kann anhand der Ermittlung der Winkel zwischen den individuellen Richtungsvektoren, die von zwei aufeinanderfolgenden, virtuellen Punkten  $Q_{[n]}$  und  $Q_{[n+1]}$  gebildet werden, sowie dem Gravitationsvektor ( $\vec{g}_0$ ) das gerichtete Wurzelwachstum beschrieben werden. Je größer die Anzahl der Segmente ( $s$ ) gewählt wird, desto genauer kann das Wurzelwachstum abgebildet werden. Hier exemplarisch gezeigt für  $s=1$ ,  $s=3$ ,  $s=5$  und  $s=12$ . (B) Die mithilfe des Programms *GravProtractor* ermittelten individuellen Segmentwinkel werden vom Programm in  $30^\circ$  Intervallen gruppiert. (C) Diese Intervalle können genutzt werden, um den proportionalen Anteil bestimmter Wachstumsrichtungen in Richtungsdiagrammen abzubilden. (D) Bei einer Einteilung der Wurzel in wenige Segmente wird das Richtungswachstum (hier am Beispiel der Modellpflanze aus Teilabbildung A) nur sehr ungenau angenähert, wohingegen eine größere Anzahl von Segmenten die Genauigkeit erhöht (siehe auch Teilabbildung A). In den meisten Fällen ist eine Einteilung in  $s=100$  Segmente ausreichend genau. Die Genauigkeit wird dann durch eine weitere Erhöhung der Segmentzahl nicht mehr wesentlich erhöht (vergleiche Richtungsdiagramm für  $s=100$  und  $s=200$  Segmente).

### 2.2.4.3. Nachweis von Auxin-Effekten in *DR5::GUS*-Pflanzen

Fünf Tage alte auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Agar gewachsene *XVE-TaLCT1/DR5::GUS*-Pflanzen wurden zunächst auf neue Estradiol-freie und Estradiol-haltige ( $0,2 \mu\text{M}$ )  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten umgesetzt. Nach weiteren drei Tagen wurden die Pflanzen für 24 Stunden erneut auf frisch hergestellte Agarplatten mit und ohne Estradiol, die nun zusätzlich  $0,5 \mu\text{M}$  1-NAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) enthielten, umgesetzt.

Zur Sichtbarmachung der GUS-Aktivität wurden pro Versuch gleichzeitig je eine *TaLCT1*-exprimierende und eine nicht-exprimierende Pflanze direkt von den Agarplatten in GUS-Färbelösung (Kpt. 2.2.5.1) überführt, für 5 Minuten im Exsikkator mit Unterdruck vakuumfiltriert und bei Raumtemperatur inkubiert. Die fortschreitende GUS-Färbung wurde permanent am Stereomikroskop kontrolliert (Kpt. 2.2.5.5).

Unmittelbar zu dem Zeitpunkt (nach ca. 20 bis 30 Minuten), an dem eine leichte aber deutliche Blaufärbung in der Wurzel der *TaLCT1*-exprimierenden Pflanze zu erkennen war, wurden beide, die *TaLCT1*-exprimierende und die nicht-exprimierende Pflanze, sofort vorsichtig in 80% Ethanol gespült und darin gelagert, um den Färbeprozess zu stoppen. Die anschließende Mikroskopie der Wurzeln erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben.

### 2.2.4.4. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit dem Programm *RStudio* v0.98.501 (RStudio Inc., Boston, USA) inklusive der Erweiterungen *agricolae* v1.2-1 (F. De Mendiburu) und *car* v2.0-21 (*Companion to Applied Regression*; J. Fox & S. Weisberg) durchgeführt.

Allgemein wurden in der Arbeit die in Tabelle 2.2.4 aufgeführten statistischen Tests verwendet. Die individuell verwendeten Tests sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil genannt.

**Tabelle 2.2.4**    **Verwendete statistische Tests**

Statistischer Test	Test auf	Bedingungen
Shapiro-Wilk Test	Normalverteilung	Stichprobengröße $n \geq 3$
F-Test	Varianzhomogenität	2 Stichproben
Student'scher <i>t</i> -Test	Unterschiedliche Mittelwerte von 2 Stichproben	1. normalverteilte Stichproben 2. Varianzhomogenität und gleiche Stichprobengrößen
Welch's <i>t</i> -Test	Unterschiedliche Mittelwerte von 2 Stichproben	1. normalverteilte Stichproben 2. Ungleiche Varianz oder unterschiedliche Stichprobengrößen
Levene Test	Varianzhomogenität	mehr als 2 Stichproben
Tukey's HSD-Test	Unterschiedliche Mittelwerte von mehr als 2 Stichproben	1. normalverteilte Stichproben 2. Varianzhomogenität und gleiche Stichprobengrößen

## 2.2.5. Färbemethoden & Mikroskopie

### 2.2.5.1. Histochemische GUS-Färbung

Zur Visualisierung der Auxin-aktivierten *DR5::GUS*-Expression anhand der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität in Wurzelspitzen wurden auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten angezogene *DR5::GUS*-transformierte Arabidopsis-Pflanzen in Petrischalen mit frisch hergestellter GUS-Färbelösung (s.u.) überführt und für 5 Minuten im Exsikkator mit Unterdruck vakuumfiltriert. Anschließend wurden die Pflanzen bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (die Dauer der Inkubation ist den entsprechenden Abbildungsunterschriften im Ergebnisteil zu entnehmen). Beendet wurde die Färbung durch Überführung der

Pflanzen in 80% Ethanol, wo sie bis auf Weiteres bei Raumtemperatur gelagert wurden.

Für die Auswertung wurden Wurzelspitzen auf Objektträger mit Chloralhydrat-Lösung (2,5 g Chloralhydrat plus 1 mL 30% Glycerin) eingedeckt und anschließend mikroskopiert. Die Mikroskopie erfolgte am Axio-Observer.Z1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit Nomarski-Differentialinterferenzkontrast (DIC). Farbige DIC-Bilder wurden mit einer K20D SLR Digitalkamera (Pentax, Tokio, Japan) durch das Okular des Mikroskops aufgenommen.

### GUS-Färbelösung

100 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)
10 mM	EDTA
3 mM	$K_4[Fe_2(CN_6)]$
0,5 mM	$K_3[Fe_2(CN_6)]$
0,1%	Triton X-100
• gelöst in mqH <sub>2</sub> O	
2 mM	X-Gluc (→ 5 mL * L <sup>-1</sup> Stammlösung (400 mM X-Gluc gelöst in DMSO))

### **2.2.5.2. Färbung von Statolithenstärke mit Lugol'scher Lösung**

Zur Sichtbarmachung von Statolithenstärke in Amyloplasten wurden Arabidopsis-Wurzeln für 60 Sekunden in frische Lugol'sche Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>dem</sub> vorsichtig gespült. Die gefärbten Wurzelspitzen wurden umgehend in Chloralhydrat-Lösung (2,5 g Chloralhydrat plus 1 mL 30% Glycerin) eingedeckt und mikroskopiert.

Die Mikroskopie erfolgte am Axio-Observer.Z1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit Nomarski-Differentialinterferenzkontrast (DIC). Farbige DIC-Bilder wurden mit einer K20D SLR Digitalkamera (Pentax, Tokio, Japan) durch das Okular des Mikroskops aufgenommen.

### **2.2.5.3. FM4-64- und Propidiumiodid-Färbung von Wurzelzellen**

Zur Färbung von Zellwänden wurden Arabidopsis-Wurzeln mit einem Tropfen Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 100 µg \* mL<sup>-1</sup> eingedeckt und umgehend mikroskopiert.

FM4-64 (SynptoRed C2; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde in einer Endkonzentration von 5 µM eingesetzt. Je nach Versuch wurden ganze Pflanzen unterschiedlich lange bei Raumtemperatur inkubiert (die Zeiten sind bei den individuellen Versuchen im Ergebnisteil genannt). Anschließend wurden die Pflanzen kurz in mqH<sub>2</sub>O gespült und mikroskopiert.

### 2.2.5.4. FM4-64 Färbung in Hefezellen

Zur Anfärbung der Plasmamembran von Hefezellen wurde auf Eis gekühlte Hefesuspension mit FM4-64 in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M gemischt und weiterhin für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Ein Tropfen dieser Suspension wurde anschließend auf einen ebenfalls auf Eis vorgekühlten Objektträger pipettiert und sofort mikroskopiert. Dieser Vorgang musste so schnell wie möglich durchgeführt werden, da das FM4-64 bei Raumtemperatur innerhalb weniger Sekunden komplett von den Hefezellen internalisiert wird.

Zur Markierung von Vakuolen dagegen wurde mit FM4-64 gemischte Hefesuspension für 30 bis 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

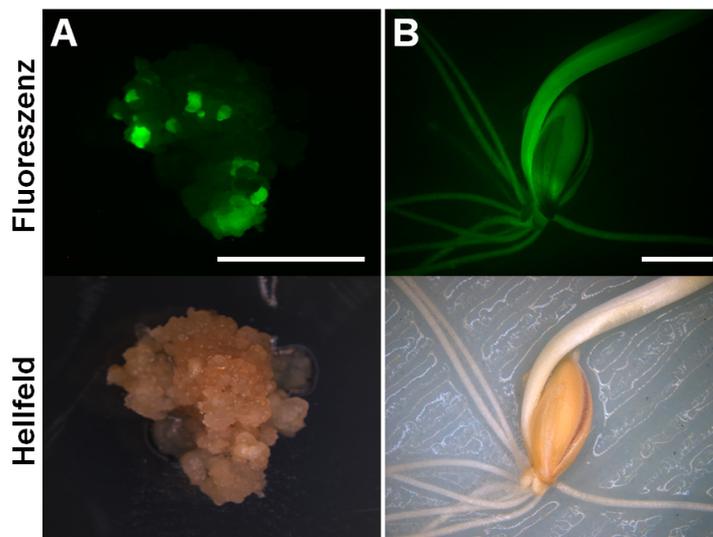
### 2.2.5.5. Mikroskopie

Bilder von kleinen Keimlingen und Gerste-Kallusgeweben wurden am SteREO Discovery V.20 Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mithilfe einer AxioCam HRc Digitalkamera (Zeiss) aufgenommen. Das Gerät wurde über die *AxioVision Software v4.8.2* (Zeiss) gesteuert. DIC- (Nomarski-Differentialinterferenzkontrast) und Fluoreszenzmikroskopie von Tabak, Hefen, Weizen- und Gerste-Protoplasten wurde mithilfe des Axio-Observer Z.1 Mikroskops (Zeiss) durchgeführt. Fotos wurden mit einer AxioCam MRm Digitalkamera (Zeiss) aufgenommen. Das Gerät wurde ebenfalls über die *AxioVision Software* gesteuert. Die Detektion von GFP/YFP erfolgte mit dem Filterset 38 HE (Ex: 450-490 nm; Em: 500-550 nm). Die Detektion von mCherry und FM4-64 erfolgte dagegen mit dem Filterset 31 (Ex: 550-580 nm; Em: 590-650 nm). Konfokale Mikroskopie von Arabidopsis-Wurzelzellen erfolgte am Eclipse 90i CLSM (Nikon Corporation, Tokio, Japan) mit einer D-Eclipse C1-SHV Kamera. Das Gerät wurde über die *EZ-C1 Software* (Nikon) gesteuert. Die Anregung von GFP und YFP erfolgte durch einen 488 nm Laser, die von FM4-64 durch einen 543 nm Laser. Die Detektion erfolgte bei 515/30 nm (GFP/YFP) bzw. 590/50 nm (FM4-64). Die abschließende Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen *ImageJ v1.48* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), *GNU Image Manipulation Program (GIMP v2.8.14)*; Spencer Kimball & Peter Mattis) und *CorelDRAW v11.633* (Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Konstitutive Expression von *TaLCT1* in Pflanzen und pflanzlichen Geweben

Zur Aufklärung der möglichen Funktion von *TaLCT1* wurden verschiedene Versuche unternommen, das Gen in Pflanzen bzw. pflanzlichen Geweben zu exprimieren. In ersten Ansätzen wurde versucht, *TaLCT1* konstitutiv, getrieben von einem *Ubiquitin*-Promoter aus Mais, in Gerste zu exprimieren. Aus diesen Versuchen konnten allerdings keine stabil transformierten Gerste-Linien erhalten werden, die das *TaLCT1*-Gen trugen. Parallel durchgeführte Transformationen mit dem Expressionsvektor *pLH6000-YC3.6* (YC3.6 kodiert für das fluoreszierende Protein Yellow-Cameleon 3.6 (Nagai *et al.*, 2004)) sowie Gerste-Transformationen im Rahmen anderer Forschungsprojekte innerhalb der Arbeitsgruppe waren dagegen erfolgreich, sodass Fehler in der Methodik weitgehend ausgeschlossen werden konnten (Abb. 3.1).



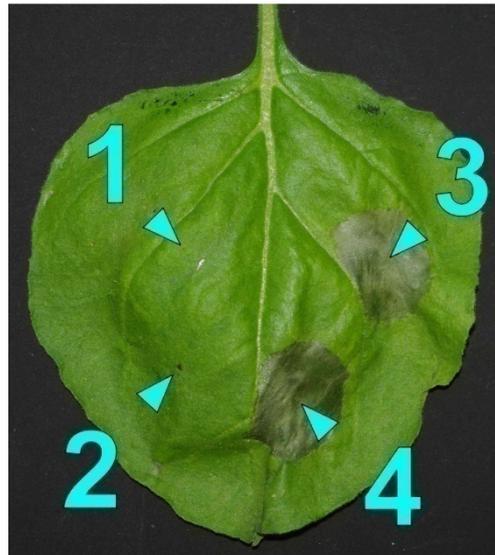
**Abbildung 3.1.** Ergebnisse der Gerste-Transformation mit dem binären Expressionsvektor *pLH6000-YC3.6*.

Das Gen YC3.6 kodiert für das fluoreszierende Protein Yellow-Cameleon 3.6, dessen Expression durch einen konstitutiv aktiven *Ubiquitin*-Promotor reguliert wird. **(A)** Embryonales Gerste-Kallusgewebe, welches partiell das YC3.6-Gen exprimiert (Foto: Juliane Weinmann & Dr. Heidrun Beschow). **(B)** 5 Tage alter, konstitutiv YC3.6-exprimierender Gerstekeimling auf Filterpapier. Maßstab für A und B = 5 mm.

Da die Durchführung der Transformation von Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) mithilfe der *Floral-Dip* Methode im Vergleich zur Transformation von Gerstepflanzen über isolierte Embryonen methodisch unaufwendiger und weniger zeitintensiv ist, wurde in einem nächsten Ansatz versucht, *TaLCT1* stabil, reguliert über einen konstitutiv aktivierten *35S*-Promoter aus dem Blumenkohlmosaikvirus, in *Arabidopsis*-Pflanzen zu exprimieren. Allerdings konnten auch aus diesen Versuchen keine *TaLCT1*-positiven, transgenen Linien gewonnen werden. Im Gegensatz dazu

waren wiederum parallel durchgeführte Transformationen mit einem *EYFP*-tragenden Kontrollplasmid (*pBART-EYFP*) erfolgreich, sodass auch hier Fehler bei der Anwendung der Methode ausgeschlossen werden konnten.

Weitere Versuche an mit *Agrobacterium tumefaciens*-infiltrierten *Nicotiana benthamiana*-Blättern zeigten zudem, dass die transiente Expression von *TaLCT1*, wiederum getrieben von einem konstitutiv aktiven 35S-Promoter, zu Blattnekrosen führt (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2. Die transiente Expression von *TaLCT1* bzw. *TaLCT1-EYFP* in Tabakblättern führt zur beschleunigten Nekrose infiltrierter Blattbereiche.**

Die Blätter fünf Wochen alter *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen wurden an der abaxialen Epidermis mit *Agrobacterium*-Suspensionen infiltriert. Die Agrobakterien wurden zuvor mit binären Plasmidvektoren für konstitutive Proteinexpression in Pflanzen transformiert und über entsprechende antibiotikahaltige Medien selektiert. Sieben Tage nach der Infiltration der Tabakblätter sind bei den *TaLCT1*-infiltrierten Bereichen, im Gegensatz zu den Kontrollbereichen, deutliche Nekrosen zu erkennen. Nummerierung: **1** - 35S::*EYFP* (*pBART-EYFP*); **2** - 35S::- (*pBART*); **3** - 35S::*TaLCT1-EYFP* (*pBART-TaLCT1-EYFP*); **4** - 35S::*TaLCT1* (*pBART-TaLCT1*)

Die Gesamtheit dieser Beobachtungen führte zu der Hypothese, dass die starke konstitutive Expression von *TaLCT1* in Pflanzen möglicherweise letal oder zumindest wachstumshemmend wirken könnte.

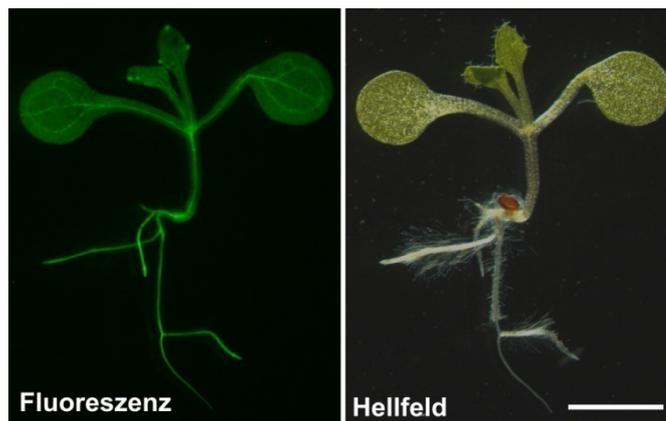
### **3.2. Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen**

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, *TaLCT1* reguliert durch ein Estradiol-induzierbares Expressionssystem (XVE; kodiert auf dem binären Vektor *pER8* (Zuo *et al.*, 2000)) in *A. thaliana* zu exprimieren. Bei diesem Versuch konnten nun mehrere *Arabidopsis*-Pflanzen mittels Hygromycin-haltigem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium selektiert werden, von denen bei mindestens 15 mittels PCR

## Ergebnisse

die erfolgreiche Insertion des Transgens (im Folgenden kurz als *XVE-TaLCT1* bezeichnet) ins Genom bestätigt werden konnte. Einige dieser Pflanzen wurden für weiterführende Experimente sowie die Gewinnung homozygoter Linien vermehrt.

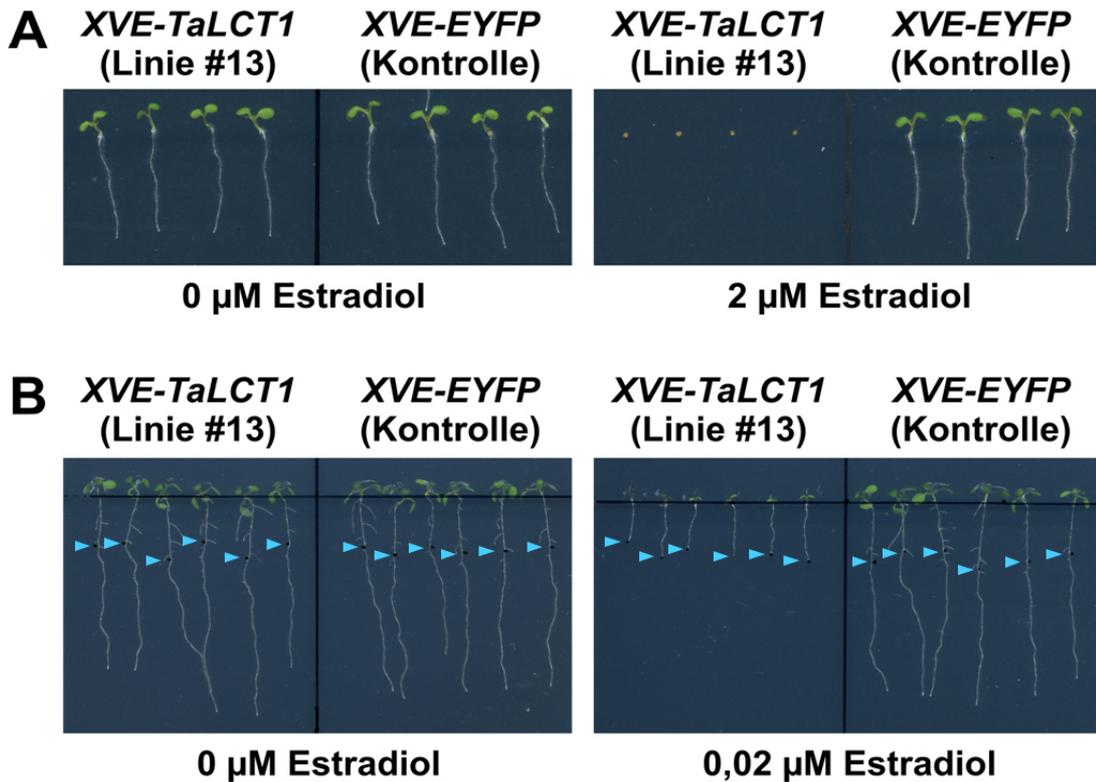
Des Weiteren wurde ein *EYFP*-tragendes Plasmid (*pER8-XVE-EYFP*) erstellt, welches ebenfalls zur Transformation von *A. thaliana*-Pflanzen herangezogen wurde. Dieses diente einerseits der Kontrolle der Transformationsprozedur und andererseits als visuelle Kontrolle einer erfolgreichen Estradiol-induzierten Genexpression (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3.** Sieben Tage alter mit *XVE-EYFP* transformierter *Arabidopsis thaliana*-Keimling. Die Expression des fluoreszierenden Proteins wurde mit 5  $\mu$ M Estradiol im Wachstumsmedium ( $\frac{1}{2}$  MS-Agar) induziert. Maßstab = 2 mm.

Bereits die ersten Versuche mit den transgenen *XVE-TaLCT1*-transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen bestätigten die Hypothese eines wachstumshemmenden Effekts durch starke *TaLCT1*-Expression. Während in Abwesenheit von Estradiol keine Wachstumsunterschiede zum Wildtyp und zu *XVE-EYFP*-Kontrollpflanzen auftraten, zeigte sich bei Anwesenheit von Estradiol im Medium eine deutlich verzögerte oder sogar komplett ausbleibende Keimung der *XVE-TaLCT1*-Samen (Abb. 3.4.A). Der Keimungsprozess der Samen endete spätestens beim Durchbruch des Endosperms. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei den Kontrollpflanzen keine Unterschiede zwischen dem Wachstum auf Estradiol-haltigem und -freiem Medium, womit ein genereller wachstumsbeeinflussender Effekt des Estradiols ausgeschlossen werden kann. Die Estradiol-induzierte Genexpression konnte mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops durch deutliche Fluoreszenz der *XVE-EYFP*-Pflanzen bei Wachstum auf Estradiol verifiziert werden (Abb. 3.3).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.4.** Die starke Expression von *TaLCT1* in *Arabidopsis thaliana* bewirkt eine starke Wachstumsinhibition.

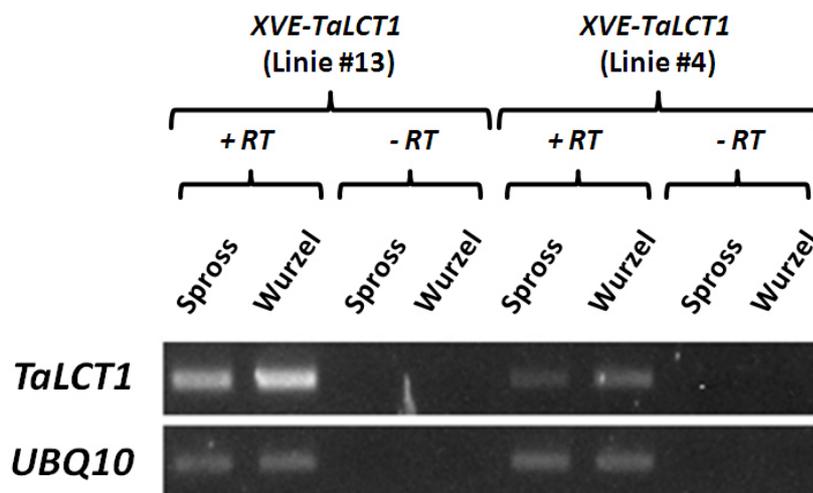
(A) Die Samenkeimung von *TaLCT1*-exprimierenden Arabidopsis-Linien ist auf Estradiol-haltigem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium verzögert oder inhibiert (Keimung und Wachstum nach 5 Tagen). (B) Der Transfer 5 Tage alter Arabidopsis-Pflanzen, die zuvor auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium vorkultiviert wurden, auf neues Estradiol-haltiges Medium zieht einen unmittelbaren Wachstumsarrest *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen nach sich (Wachstum nach 4 Tagen). Hellblaue Pfeilspitzen markieren die Wurzellängen der Pflanzen zum Zeitpunkt des Transfers auf die Estradiol-haltigen  $\frac{1}{2}$  MS-Medien.

Es stellte sich die Frage, ob der beobachtete wachstumsinhibierende Effekt von *TaLCT1* nur auf frühe Entwicklungsstadien (z.B. Keimung) beschränkt ist. Dazu wurden Arabidopsis-Pflanzen zunächst 5 Tage lang auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium ohne Estradiol vorkultiviert, bevor sie auf frisches Medium mit und ohne  $0,02 \mu\text{M}$  Estradiol überführt wurden. Nach 4 weiteren Tagen zeigte sich deutlich, dass die *XVE-TaLCT1*-Pflanzen unmittelbar nach dem Transfer auf Estradiol-Medium das Wachstum komplett einstellten, wohingegen dieser Effekt auf Estradiol-freiem Medium ausblieb und kein Unterschied im Vergleich zum Wachstum der Kontrollpflanzen festgestellt werden konnte (Abb. 3.4.B). Auch bei diesem Versuch war kein Effekt des Estradiols auf das Wachstum der Kontrollpflanzen zu beobachten.

## 3.3. Phänotypen schwach *TaLCT1*-exprimierender *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

### 3.3.1. Frühe Keimlingsentwicklung

Obwohl sich herausstellte, dass die überwiegende Zahl der untersuchten mit *XVE-TaLCT1* transformierten *Arabidopsis*-Linien die oben erwähnten starken Wachstumsinhibitionen aufweisen, konnten im weiteren Verlauf 3 unabhängige Linien gefunden werden, die schwächere Inhibitionsphänotypen (z.B. weniger stark inhibiertes Wurzelwachstum (Abb. 3.9)) zeigten. Zwei dieser Linien (#4 und #7), die auch für weitere Experimente verwendet wurden, konnten mittels Segregationsanalyse als homozygot identifiziert werden. Die Hypothese, dass die schwächeren Phänotypen dieser Linien möglicherweise durch eine geringere Expression von *TaLCT1* zu erklären sind, konnte mithilfe semi-quantitativer Reverse Transcription-PCR (sqRT-PCR) bestätigt werden (Abb. 3.5).



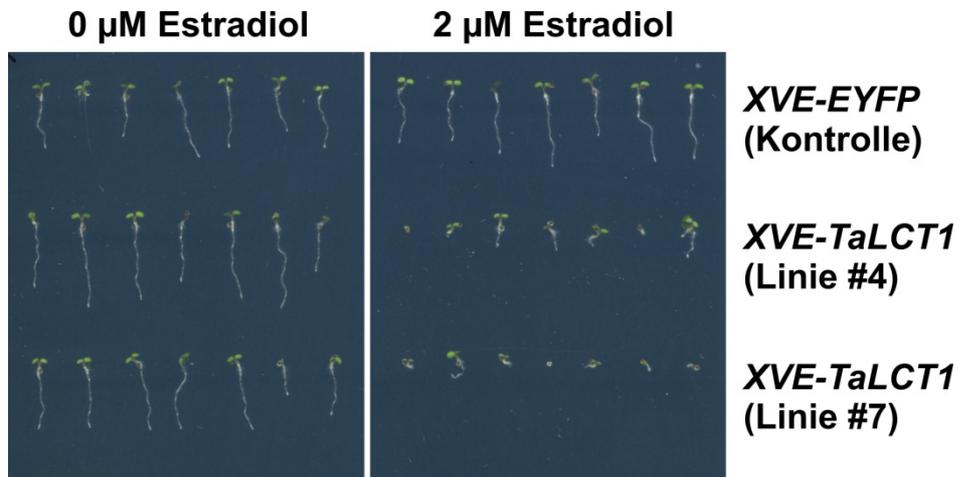
**Abbildung 3.5.** Die *XVE-TaLCT1*-transformierten *A. thaliana*-Linien #13 und #4 zeigen unterschiedlich starke *TaLCT1*-Expression.

Pflanzen wurden auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Agar gekeimt, 5 Tage kultiviert und auf Estradiol-haltiges Medium umgesetzt. Zwei Tage auf Estradiol-haltigem  $\frac{1}{2}$  MS-Agar gewachsene Pflanzen wurden in Wurzel und Spross geteilt und für RNA-Extraktionen weiterverwendet. Der Nachweis der *TaLCT1*-Expression erfolgte mithilfe sqRT-PCR. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurden jeweils RNA-Proben getestet, die mit (+RT) und ohne das Enzym Reverse Transkriptase (-RT) behandelt wurden. Zur Kontrolle der korrekten cDNA-Synthese und gleichmäßiger Beladung des Agarosegels wurde *Polyubiquitin 10* (*AtUBQ10*; At4G05320) als *Housekeeping*-Gen eingesetzt.

Obwohl die Samen der Linien #4 und #7 auf Estradiol-haltigem Medium keimten (Abb. 3.6), wiesen die heranwachsenden Pflanzen deutliche morphologische Defekte, insbesondere in der Entwicklung der postembryonalen Wurzel, auf. Im Gegensatz zum Wurzelwachstum waren die Effekte auf das Sprosswachstum allenfalls marginal. Die zu beobachtenden Phänotypen reichten von Keimlingen mit schwach inhibierter

## Ergebnisse

Wurzelelongation und zahlreichen Wurzelhaaren bis hin zu solchen mit sehr stark inhibierter Wurzelelongation und komplett ausbleibendem Wurzelhaarwachstum.



**Abbildung 3.6. Heranwachsende, schwach *TaLCT1*-exprimierende *A. thaliana*-Keimlinge zeigen morphologische Defekte, besonders in der Wurzelentwicklung.**

Im Gegensatz dazu ist das Wachstum der *XVE-EYFP*-Kontrollpflanzen auf dem Estradiol-haltigen Medium nicht beeinflusst. Keimung und Wachstum der Pflanzen erfolgten für 5 Tage auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium.

Diese Beobachtungen führten zur Einteilung der Keimlinge in drei Gruppen:

1. Keimlinge mit stark retardierter Wurzelelongation und keinen Wurzelhaaren (Abb. 3.7.A)
2. Keimlinge mit stark retardierter Wurzelelongation und wenigen oder vielen Wurzelhaaren (Abb. 3.7.B+C)
3. Keimlinge mit schwächer inhibierter Wurzelelongation und wenigen oder vielen Wurzelhaaren (Abb. 3.7.D+E)



**Abbildung 3.7. Phänotypen von *TaLCT1*-exprimierenden *Arabidopsis*-Keimlingen.**

Die Abbildung zeigt 5 Tage alte, auf Estradiol-haltigem (2 µM)  $\frac{1}{2}$  MS-Agar gekeimte und gewachsene Keimlinge, sortiert nach der Stärke der auftretenden morphologischen Defekte. (A) Gruppe 1 wird repräsentiert durch Keimlinge ohne Wurzelhaare und stark inhibiertem Wurzelwachstum. (B+C) In Gruppe 2 finden sich Keimlinge mit Wurzelhaaren und ebenfalls stark inhibiertem Wurzelwachstum. (D+E) Gruppe 3 bilden Keimlinge mit Wurzelhaaren und moderat inhibiertem Wurzelwachstum. Maßstabsbalken = 1 mm.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse weiterer Experimente zeigten, dass diese, nach morphologischen Gesichtspunkten vorgenommene, Gruppierung zum Teil mit weiteren graduell abgestuften Defekten einhergeht. So zeigte zum Beispiel die Färbung der Pflanzen mit Lugol'scher Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung) eine reduzierte Bildung von Statolithenstärke in den Wurzelspitzen (Abb. 3.8). Dieser Effekt war am stärksten in Wurzelspitzen von Keimlingen der Gruppe 1, in denen oftmals gar keine Statolithenstärke mit dieser Methode nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 3.8. Die Färbung 5 Tage alter *TaLCT1*-exprimierender Keimlinge mit Lugol'scher Lösung zeigt geringe oder gar keine Bildung von Statolithenstärke in den Wurzelspitzen.**

**(A+B)** Dieser Effekt ist am stärksten in Wurzelspitzen von Keimlingen der Gruppe 1. **(C+D)** In Keimlingen der Gruppe 2 ist Statolithenstärke schwach nachweisbar. Die Abbildungen B und D sind jeweils Vergrößerungen der Wurzelspitzen der Abbildungen A und C. Maßstabsbalken für A + C = 0,2 mm; für B + D = 0,1 mm.

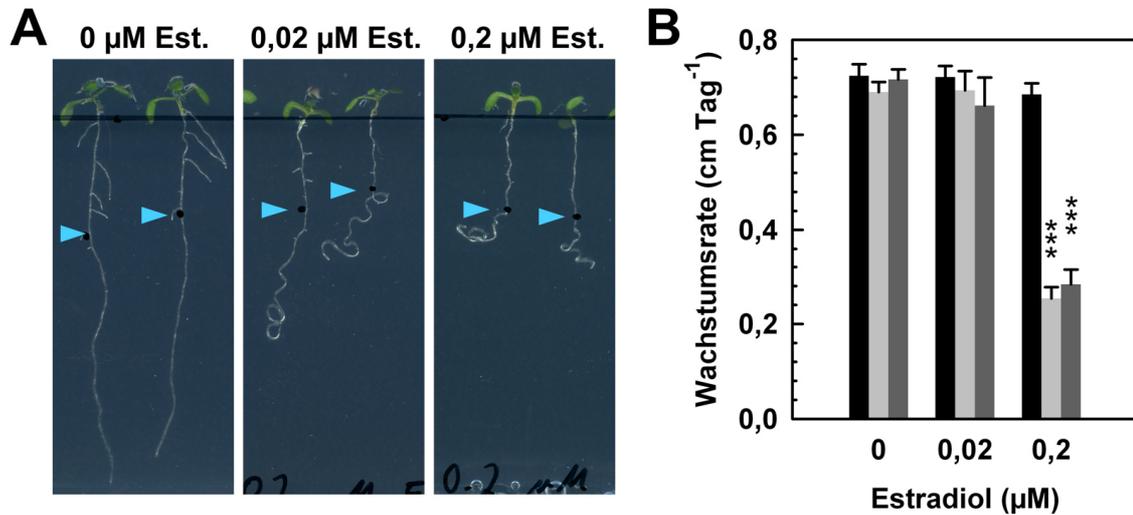
### 3.3.2. Weiteres Keimlingswachstum

#### 3.3.2.1. Wurzelwachstumsraten und Frischmassen

In Transfer-Experimenten, in denen 5 Tage alte, auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium gewachsene Pflanzen auf Estradiol-haltiges  $\frac{1}{2}$  MS-Medium umgesetzt wurden, zeigten die Pflanzen der Linien #4 und #7, ähnlich wie in den vorangegangenen Experimenten mit stark *TaLCT1*-exprimierenden Linien, eine inhibierte Elongation der Primär- und Seitenwurzeln (Abb. 3.9.A). Allerdings war dieser Effekt deutlich schwächer als bei den zuvor beschriebenen Versuchen (Abb. 3.4). Während z.B. die Pflanzen der Linie #13 bereits bei einer Estradiolkonzentration von  $0,02 \mu\text{M}$  komplett im Wachstum inhibiert waren, zeigten die Pflanzen der Linien #4 und #7 im Vergleich zu den *XVE-EYFP*-Kontrollpflanzen bei dieser Konzentration noch keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumsraten. Bei einer zehnfach höheren Estradiolkonzentration von  $0,2 \mu\text{M}$

## Ergebnisse

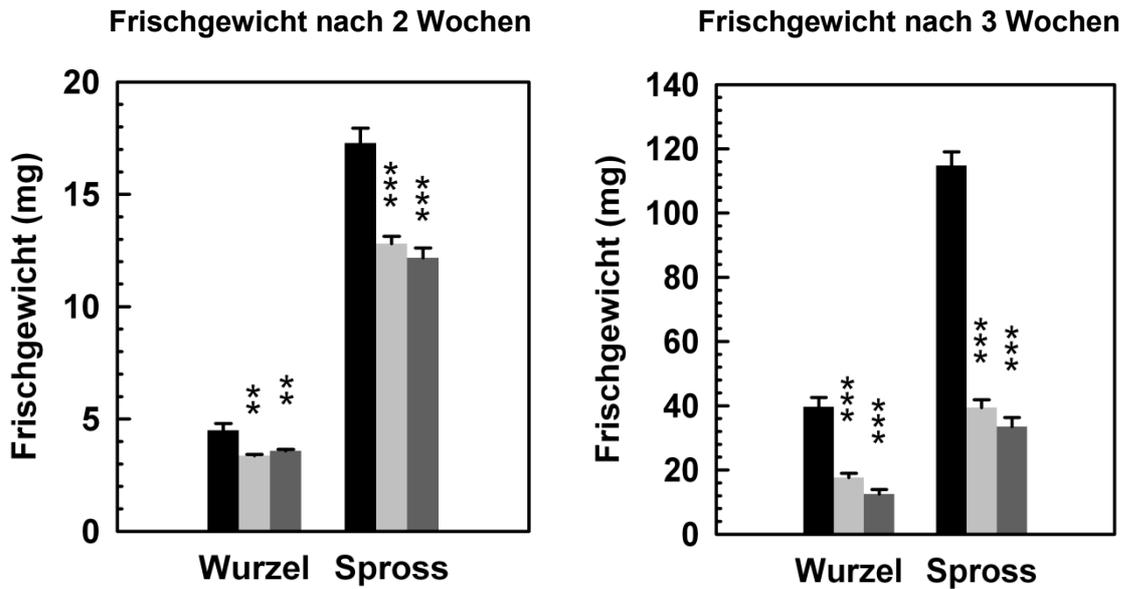
dagegen war eine signifikante Reduktion der Wurzelwachstumsraten um ca. 50% zu beobachten (Abb. 3.9.B).



**Abbildung 3.9.** Die Expression von *TaLCT1* in *Arabidopsis thaliana* bewirkt reduziertes Wachstum von Primär- und Seitenwurzeln.

(A) Pflanzen wurden fünf Tage auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium vorkultiviert, bevor sie für weitere 4 Tage auf neue Medien mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen umgesetzt wurden. Hier gezeigt *XVE-TaLCT1*-Linie #7. Hellblaue Pfeilspitzen markieren die Wurzellängen der Pflanzen zum Zeitpunkt des Transfers auf die Estradiol-haltigen  $\frac{1}{2}$  MS-Medien. (B) Ab einer Estradiolkonzentration von 0,2 µM konnte bei schwach exprimierenden *XVE-TaLCT1*-Linien eine signifikante Reduktion des Wurzellängenwachstums beobachtet werden. Schwarze Balken zeigen die Ergebnisse der *XVE-EYFP*-transformierten Kontrollpflanzen, graue Balken die Ergebnisse der zwei unabhängigen *XVE-TaLCT1*-Linien #4 und #7. Gezeigt sind die mittleren Wurzelwachstumsraten ( $\pm$  Standardfehler) eines repräsentativen Experiments von mindestens drei unabhängigen Wiederholungen und je 6 Pflanzen pro Linie und Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test, F-Test sowie Welch's *t*-Test (\*\*\*)  $P < 0,001$ ).

Wie bei den direkt auf Estradiol-haltigem Medium gekeimten und gewachsenen Pflanzen (Abb. 3.7) waren auch bei den transferierten Pflanzen infolge der *TaLCT1*-Expression zunächst keine unmittelbaren drastischen Effekte auf die Sprossentwicklung zu beobachten. Nach zweiwöchigem Wachstum in Gegenwart von Estradiol waren allerdings die *XVE-TaLCT1*-Pflanzen insgesamt deutlich kleiner als die Kontrollpflanzen, was sich auch in signifikant geringeren Wurzel- und Sprossfrischgewichten widerspiegelte. Diese Unterschiede traten nach drei Wochen noch deutlicher hervor (Abb. 3.10).



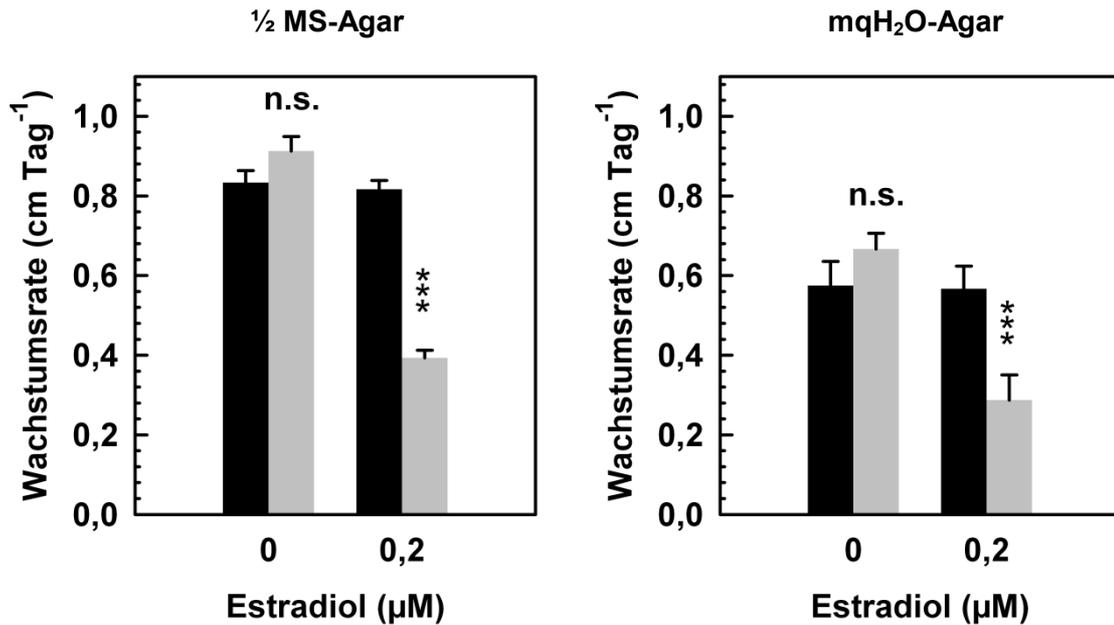
**Abbildung 3.10.** Die Expression von *TaLCT1* in Arabidopsis führt zu signifikant verringerten Frischgewichten.

Fünf Tage alte auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium vorkultivierte Pflanzen wurden auf neues Estradiol-haltiges ( $0,2 \mu\text{M}$ ) Medium umgesetzt. Wurzel- und Sprossfrischgewichte von *XVE-TaLCT1*- und *XVE-EYFP*-transformierten Pflanzen wurden nach zwei und drei Wochen gemessen. Schwarze Balken zeigen die Ergebnisse der *XVE-EYFP*-transformierten Kontrollpflanzen, graue Balken die Ergebnisse der beiden *XVE-TaLCT1*-Linien #4 (hellgrau) und #7 (dunkelgrau). Gezeigt sind die mittleren Frischgewichte ( $\pm$  Standardfehler) eines Experiments mit 18 Pflanzen pro Linie. Die statistische Analyse erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test, F-Test sowie Welch's *t*-Test (\*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

### 3.3.2.2. Wachstumsdefekte in Abhängigkeit vom Kulturmedium

In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass *TaLCT1*-exprimierende Hefezellen bei Gegenwart bestimmter Kationen im Medium, z.B. Natriumionen, geringere Wachstumsraten aufzeigen (Amtmann *et al.*, 2001). Deshalb wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob die in *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen zu beobachtende Reduktion des Wurzelwachstums möglicherweise auf einen oder mehrere Bestandteile des Mediums zurückgeführt werden kann. Dazu wurden 5 Tage alte *XVE-TaLCT1*- und *XVE-EYFP*-Pflanzen auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar und auf mqH<sub>2</sub>O-Agar (Millipore-Wasser ohne Zugabe von MS-Salzen; beide Medien mit 1% Saccharose) überführt und weitere 4 Tage kultiviert. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigte, wie zu erwarten, ein verzögertes Wachstum aller Pflanzen auf dem mqH<sub>2</sub>O-Agar infolge verringerter Nährstoffverfügbarkeit. Allerdings konnte auch hier bei den *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen eine vergleichbare Reduktion der Wurzelwachstumsrate um ca. 50% beobachtet werden wie auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar (Abb. 3.11).

## Ergebnisse

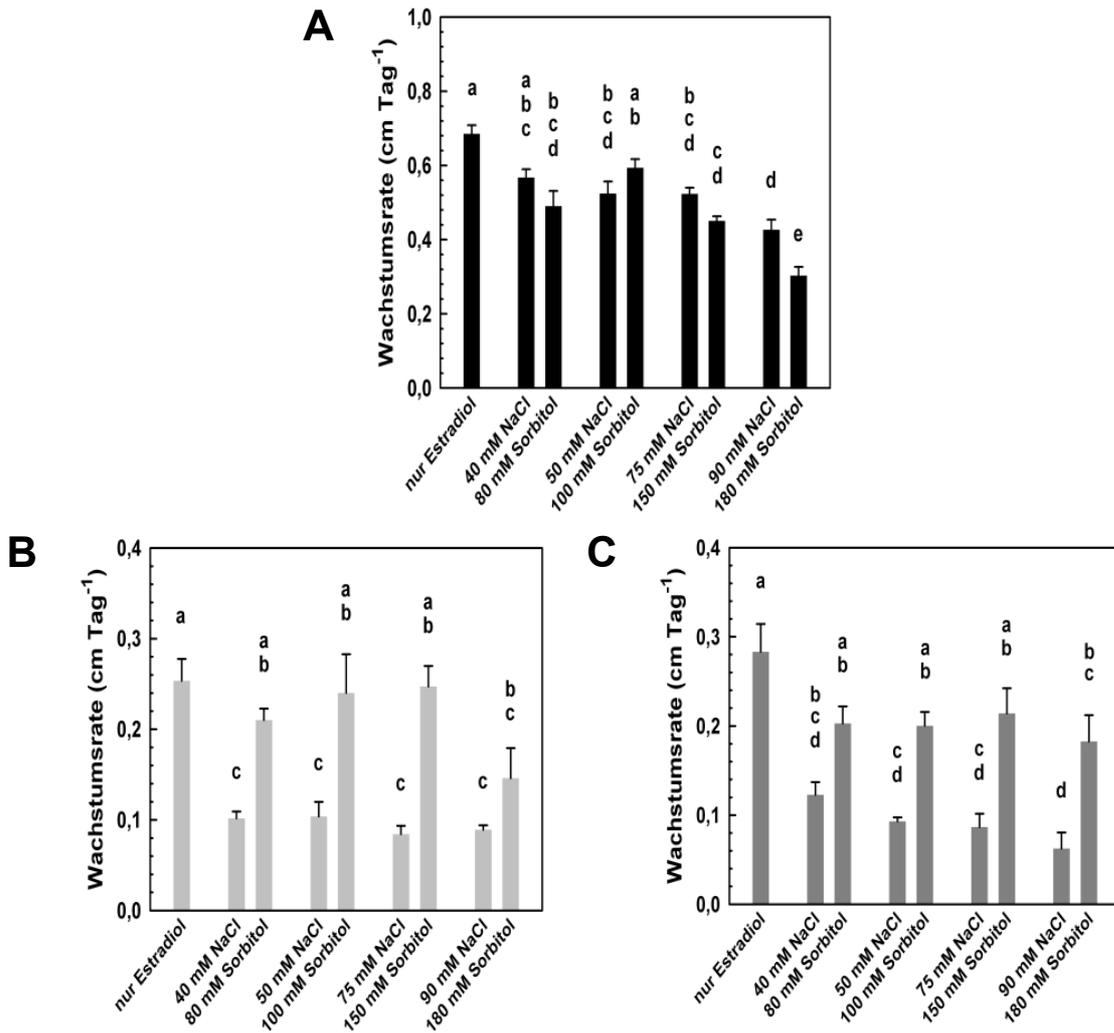


**Abbildung 3.11. Die Wurzelwachstumsinhibition von *A. thaliana* infolge der *TaLCT1*-Expression ist unabhängig von der Zusammensetzung des Kulturmediums.**

*XVE-TaLCT1*- sowie *XVE-EYFP*-transformierte Arabidopsis-Pflanzen wurden 5 Tage auf Estradiol-freiem ½ MS-Medium vorkultiviert, bevor sie für 4 weitere Tage auf frisches Medium ohne oder mit 0,2 µM Estradiol überführt wurden. Um einen möglichen Effekt von Medienbestandteilen auf das Wachstum der Pflanzen zu überprüfen, wurde ein Agarmedium ausschließlich mit Millipore-gereinigtem Wasser (mQH<sub>2</sub>O) angesetzt; das Kontrollmedium war ½ MS-Agar. Beide Medien enthielten darüberhinaus 1% Saccharose. Schwarze Balken zeigen die Ergebnisse der *XVE-EYFP*-transformierten Kontrollpflanzen, graue Balken die Ergebnisse der *XVE-TaLCT1*-Linie #4. Gezeigt sind die mittleren Wurzelwachstumsraten (± Standardfehler) eines Experiments mit 6 Pflanzen pro Linie. Die statistische Analyse erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test, F-Test sowie Student'schem *t*-Test (n.s.  $P > 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Um zu überprüfen, ob die Wachstumsinhibition durch erhöhte Konzentrationen bestimmter Ionen verstärkt werden kann, wurden *XVE-TaLCT1*-Pflanzen der Linien #4 und #7 auf ½ MS-Medien (+ 0,2 µM Estradiol) mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen umgesetzt. Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, dass das Wurzelwachstum von *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen durch NaCl stärker inhibiert wird als durch entsprechend equiosmolale Konzentrationen von Sorbitol, was auf eine stärkere Wirkung des Ioneneffekts als des osmotischen Effekts hindeutet (Abb. 3.12). Bei den *XVE-EYFP*-transformierten Pflanzen konnte dieser Effekt dagegen nicht beobachtet werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.12. Natriumchlorid verstärkt die Wurzelwachstumsinhibition bei *TaLCT1*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen.**

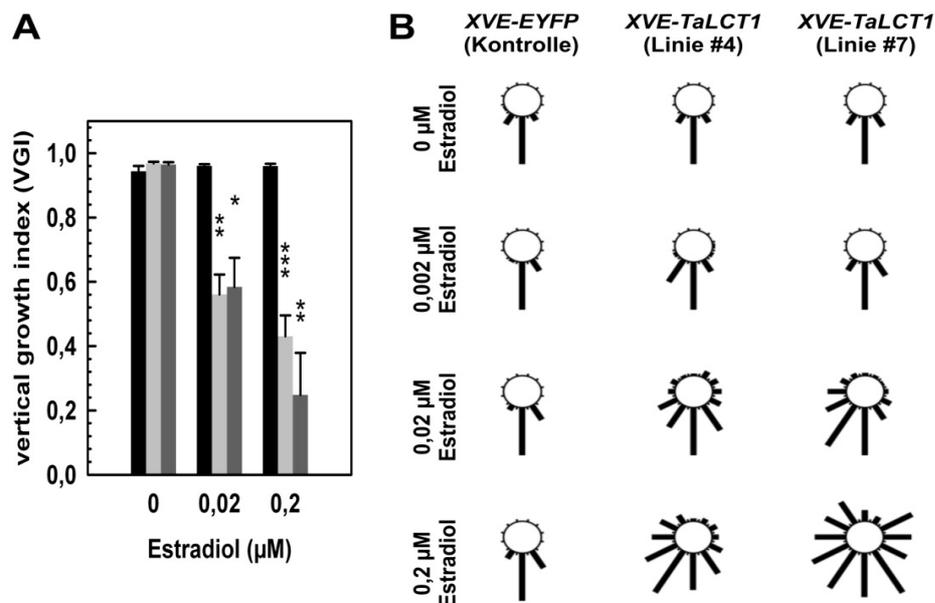
*XVE-TaLCT1*- sowie *XVE-EYFP*-transformierte Pflanzen wurden zunächst 5 Tage auf Estradiol-freiem ½ MS-Medium vorkultiviert, bevor sie auf neue Medien mit 0,2 µM Estradiol und verschiedenen Konzentrationen an NaCl und Sorbitol umgesetzt und vier weitere Tage kultiviert wurden. Gezeigt sind die mittleren Wurzelwachstumsraten (± Standardfehler) eines repräsentativen Experiments mit 6 Pflanzen pro Linie und Behandlung. Das Experiment wurde 2 mal durchgeführt. **(A)** Ergebnisse der *XVE-EYFP*-transformierten Kontrollpflanzen. **(B)** Ergebnisse der *XVE-TaLCT1*-Linien #4 und **(C)** #7. Die statistische Analyse erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test, Levene Test, sowie ANOVA gefolgt von Tukey's HSD-Test ( $P < 0,05$ ). Signifikant unterschiedliche Gruppen sind in den Diagrammen durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Sowohl die Ergebnisse der mqH<sub>2</sub>O-Agar-Versuche als auch der NaCl-Versuche deuten darauf hin, dass die durch *TaLCT1* verursachte Inhibition des Wurzelwachstums zwar durch bestimmte Veränderungen der Zusammensetzung des Kulturmediums moduliert werden kann, grundsätzlich scheint der Effekt allerdings unabhängig vom Medium und somit endogener Natur zu sein.

### 3.3.2.3. Quantifizierung gravitropischen Wurzelwachstums

Zusätzlich zu einer Verringerung des Frischgewichts sowie der Wachstumsrate war eine proportional zur Estradiolkonzentration im Medium ansteigende Agravitropie des Wurzelwachstums zu beobachten. Die Berechnung des *vertical growth index* (VGI; Grabov *et al.*, 2005) zeigt ab einer Estradiolkonzentration von 0,02  $\mu\text{M}$  für beide *XVE-TaLCT1*-Linien (#4 und #7) eine statistisch signifikante Veränderung des gravitropischen Wurzelwachstums an (Abb. 3.13.A). Dies wiederum bedeutet, dass der Effekt bereits bei einer 10-fach niedrigeren Estradiolkonzentration (0,02  $\mu\text{M}$ ) zu beobachten ist als der Effekt der Elongationsinhibition (0,2  $\mu\text{M}$ ; Abb. 3.9). Die Analyse der einzelnen Richtungsdiagramme (siehe Kpt. 2.2.4.2) deutet weiterhin darauf hin, dass die zu beobachtenden Richtungsänderungen der Wurzel scheinbar zufällig sind und keinem offensichtlichen Muster folgen (Abb. 3.13.B).

Sowohl der VGI als auch die Richtungsdiagramme lassen keinen nennenswerten Einfluss des Estradiols auf das gravitropische Wurzelwachstum der *XVE-EYFP*-Kontrollpflanzen im Bereich der getesteten Konzentrationen erkennen.



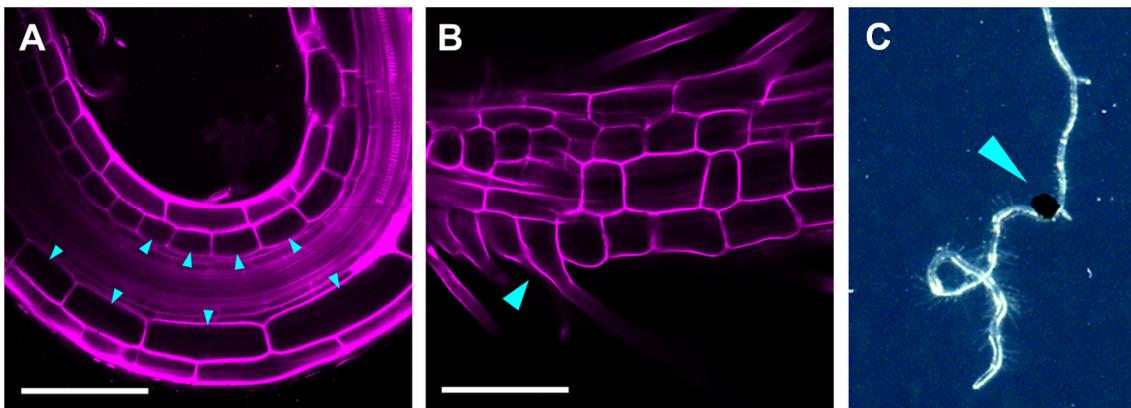
**Abbildung 3.13. Die Expression von *TaLCT1* in Arabidopsis bewirkt Störungen des gravitropischen Wurzelwachstums.**

(A) Die Berechnung des *Vertical Growth Index* (VGI; Grabov *et al.*, 2005) zeigt ab einer Konzentration von 0,02  $\mu\text{M}$  Estradiol im Medium einen signifikanten Effekt auf das gravitropische Wurzelwachstum in *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen. Schwarze Balken zeigen die Ergebnisse der *XVE-EYFP*-transformierten Kontrollpflanzen, graue Balken die Ergebnisse der zwei unabhängigen *XVE-TaLCT1*-Linien #4 und #7. Gezeigt sind die mittleren *vertical growth indices* ( $\pm$  Standardfehler) eines repräsentativen Experiments von mindestens drei unabhängigen Wiederholungen und je 6 Pflanzen pro Linie und Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test, F-Test sowie Welch's *t*-Test (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ). (B) Die Richtungsdiagramme zeigen bei ansteigender Estradiolkonzentration einen graduell zunehmenden Wurzelagravitropismus bei *XVE-TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen.

### 3.3.3. Mikroskopische Analysen der Wurzeln *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen

Um die Störungen im Wurzelwachstum *TaLCT1*-exprimierender *A. thaliana*-Pflanzen näher zu charakterisieren, wurden mikroskopische Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen entstanden in Kollaboration mit Dr. Jens Müller (IPB, Halle, Deutschland).

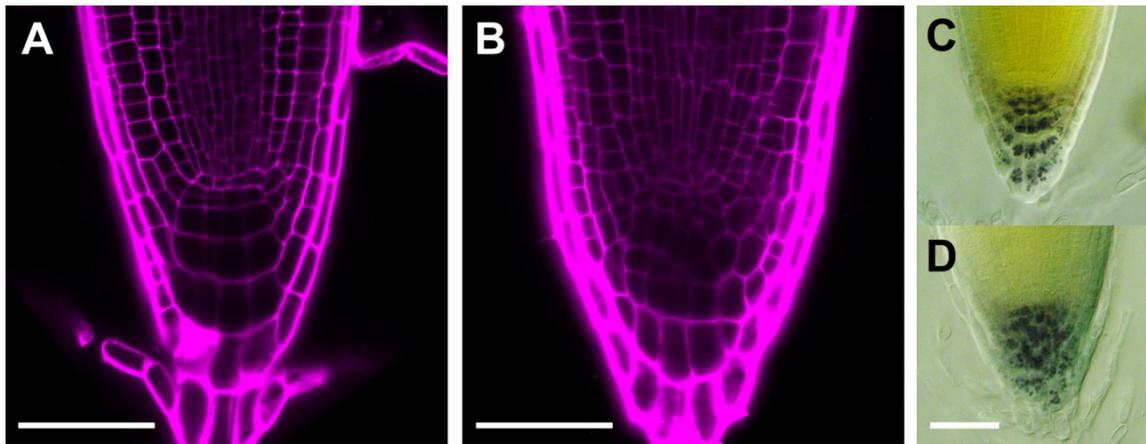
Für die Analysen wurden fünf Tage alte Arabidopsis-Pflanzen für vier Tage auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarmedium (+0,2  $\mu$ M Estradiol) weiterkultiviert. Zur Hervorhebung der Zellwände wurden die Wurzeln unmittelbar vor dem Mikroskopieren mit Propidiumiodidlösung gefärbt (Kpt. 2.2.5.3). Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die veränderte Wurzelmorphologie der Pflanzen mit einer reduzierten und irregulären Zellelongation einhergeht (Abb. 3.14.A). Dies wiederum äußert sich in den beobachteten Effekten auf das Längenwachstum und das gravitropische Wachstum der Wurzel. Des Weiteren führt eine reduzierte Elongation der Trichoblasten zu einer häufig zu beobachtenden Erhöhung der Wurzelhaardichte (Abb. 3.14.B+C).



**Abbildung 3.14. Die Wurzeln *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen zeigen irreguläre und inhibierte Zellelongation.**

(A) Die irreguläre Zellelongation (vergleiche mit Pfeilspitzen markierte Zellschichten) führt zu wellen- und schlaufenartigem Wurzelwachstum. (B) Die inhibierte Zellelongation von Trichoblasten (Pfeilspitze) führt zu einer z.T. stark erhöhten Wurzelhaardichte. Die Wurzeln *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen wurden mit Propidiumiodid gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Maßstabsbalken für A und B = 100  $\mu$ m. (C) Makroskopisches Bild der Wurzel einer *TaLCT1*-exprimierenden Arabidopsis-Pflanze der Linie #4 (4 Tage gewachsen auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar mit 0,2  $\mu$ M Estradiol). Die Pfeilspitze markiert das Wurzelwachstum zum Zeitpunkt des Transfers auf das Estradiol-haltige Medium.

Sowohl mithilfe konfokaler Mikroskopie als auch durch Lichtmikroskopie nach Färbung mit Lugol'scher Lösung (Kpt. 2.2.5.2) waren in den Wurzelspitzen darüberhinaus häufig moderate Störungen der Zellorganisation, besonders im Bereich der Columella und des ruhenden Zentrums, zu beobachten (Abb. 3.15).



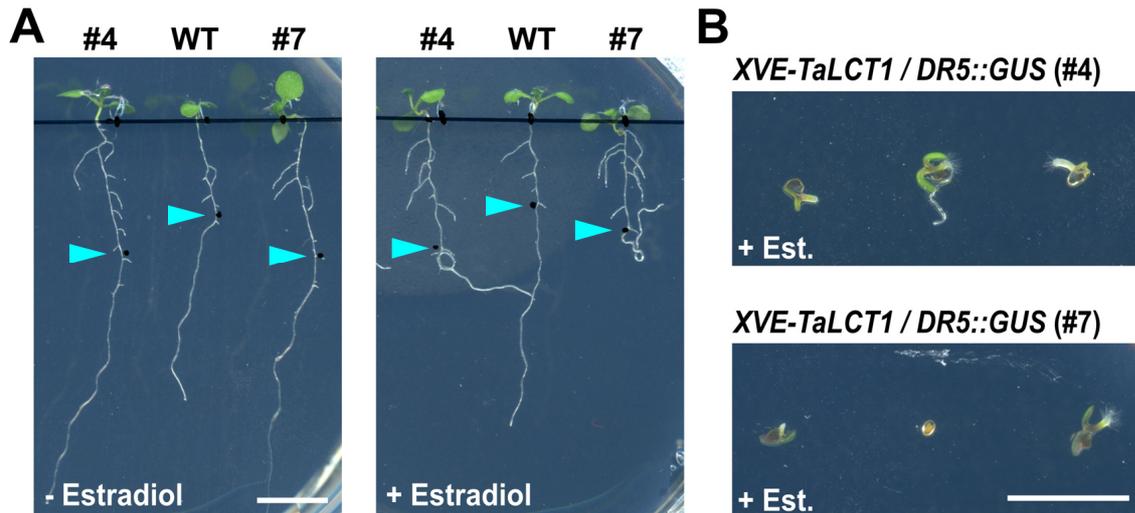
**Abbildung 3.15. Wurzelspitzen *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen zeigen moderate Störungen der Zellorganisation im Bereich der Columella und des Ruhenden Zentrums.**

**(A+B)** Färbung mit Propidiumiodid und Analyse mit konfokaler Mikroskopie. **A.** *XVE-EYFP*-Pflanze; **B.** *XVE-TaLCT1*-Pflanze. Beide Pflanzen waren auf Medium mit 0,2  $\mu$ M Estradiol gewachsen. **(C+D)** Färbung mit Lugol'scher Lösung und Analyse mit Differentialinterferenzkontrastmikroskopie. **C.** *XVE-TaLCT1*-Pflanze gewachsen auf Estradiol-freiem Medium; **D.** *XVE-TaLCT1*-Pflanze gewachsen auf Medium mit 0,2  $\mu$ M Estradiol. Maßstabsbalken für A-D = 50  $\mu$ m.

### 3.4. Auxinhomöostase in *TaLCT1*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen

Das Phytohormon Auxin wurde in zahlreichen Studien als ein Schlüsselregulator vieler physiologischer Prozesse beschrieben. Zu den Prozessen, für die eine maßgebliche Beteiligung von Auxin gezeigt ist, gehören unter anderem die Regulation der Zellelongation, des gravitropischen Wachstums und die Bildung und Aufrechterhaltung des apikalen Wurzelmeristems (Tanaka *et al.*, 2006). Aus der Summe der vorherigen Beobachtungen ergab sich daher die Frage, ob *TaLCT1* möglicherweise in das Netzwerk dieses Phytohormons eingreift. Um diese Frage zu beantworten, wurden die *XVE-TaLCT1*-Linien #4 und #7 mit Pflanzen gekreuzt, die das synthetische Auxin-Reportergenkonstrukt *DR5::GUS* tragen (Ulmasov *et al.*, 1997). Die aus diesen Kreuzungen resultierenden Pflanzen zeigten vergleichbare Defekte bei Keimung und Wachstum auf Estradiol-haltigem Kulturmedium, wie die parentalen *XVE-TaLCT1*-Linien (Abb. 3.16).

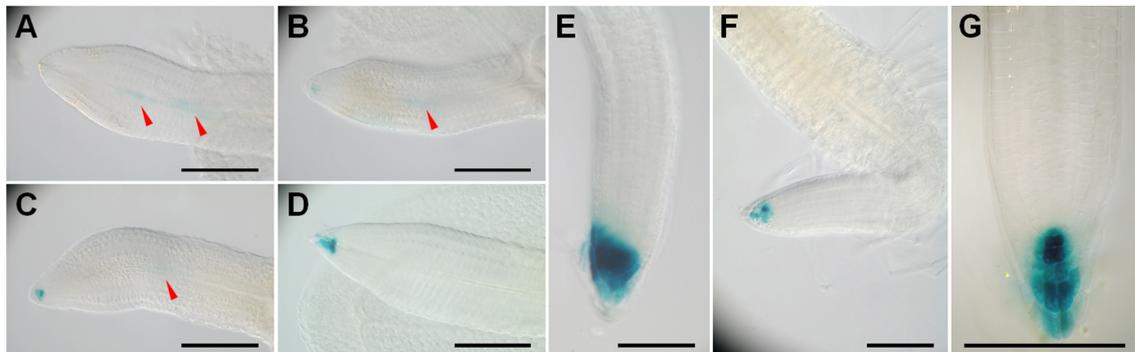
## Ergebnisse



**Abbildung 3.16. Gekreuzte *XVE-TaLCT1/DR5::GUS*-Pflanzen der Linien #4 und #7 zeigen Phänotypen wie die parentalen *XVE-TaLCT1*-Linien.**

(A) Fünf Tage alte, auf Estradiol-freiem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium vorkultivierte Pflanzen wurden für vier weitere Tage auf neue, Estradiol-freie und Estradiol-haltige  $\frac{1}{2}$  MS-Medien ( $0,02 \mu\text{M}$  Estradiol) umgesetzt. Blaue Pfeilspitzen markieren die Wurzellänge zum Zeitpunkt des Transfers. (B) Phänotypen von *XVE-TaLCT1/DR5::GUS*-Keimlingen, die 5 Tage auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit  $2 \mu\text{M}$  Estradiol gekeimt und gewachsen sind. Maßstab für A = 1 cm; für B = 5 mm.

In sich anschließenden GUS-Färbungen (3 Stunden Inkubation) zeigten 5 Tage alte *XVE-TaLCT1*-Keimlinge der Gruppe 1 (siehe Abb. 3.7), die direkt auf Medium mit  $2 \mu\text{M}$  Estradiol gekeimt waren, stark reduzierte GUS-Aktivität in den Wurzelspitzen, was verringerte Auxinkonzentrationen vermuten lässt (Abb. 3.17.A-D).



**Abbildung 3.17. *DR5::GUS*-Färbungen in jungen *TaLCT1*-exprimierenden Keimlingen der Linien #4 und #7.**

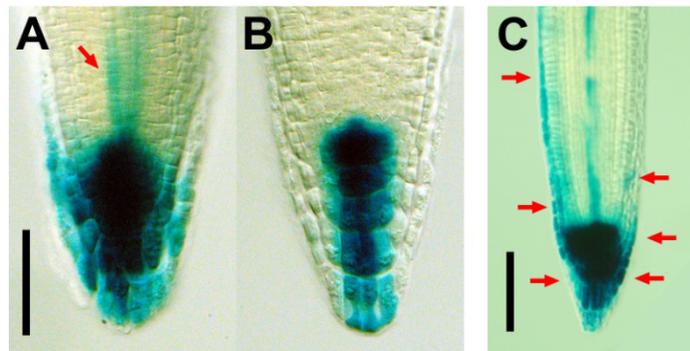
(A-D) Fünf Tage alte auf Estradiol-haltigem Medium gekeimte *XVE-TaLCT1/DR5::GUS*-Keimlinge der Gruppe 1 (s.o.) zeigen stark verringerte GUS-Signale in den Wurzelspitzen. Dagegen sind zum Teil schwache Signale im Bereich des Zentralzylinders zu erkennen (Pfeilspitzen). (E) Keimlinge der Gruppe 3 zeigen ein verbreitertes und asymmetrisches Färbemuster. (F) Das Färbemuster von Keimlingen der Gruppe 2 liegt zwischen dem von Gruppe 1 und Gruppe 3. (G) Fünf Tage alter *DR5::GUS*-Wildtyp. Alle abgebildeten Pflanzen wurden gleichermaßen für 3 Stunden gefärbt. Maßstabsbalken für A-G = 100  $\mu\text{m}$ .

Stattdessen waren GUS-Signale oftmals in den Stelen der Pflanzen zu erkennen. Im Gegensatz zu den Keimlingen der Gruppe 1, zeigten Keimlinge der Gruppen 2 und 3, die schwächere morphologische Defekte aufweisen (Abb. 3.7), deutlich stärkere

## Ergebnisse

GUS-Aktivität in den Wurzelspitzen. Insbesondere letztere waren in der Intensität ihrer Blaufärbung nicht von den Signalen gleichalter *DR5::GUS*-Wildtyp-Pflanzen zu unterscheiden. Allerdings waren die GUS-Signale in diesen Pflanzen oft ausgedehnter, was auf eine veränderte Auxinverteilung in den Wurzelspitzen der *XVE-TaLCT1*-Keimlinge deutet (Abb. 3.17.E+G).

Eine ähnliche Verbreiterung der GUS-Signale zeigte sich auch bei Pflanzen, die auf Estradiol-freiem Medium vorkultiviert wurden (5 Tage) und anschließend auf Estradiol-haltige Medien transferiert wurden (4 Tage). Die 9 Tage alten Pflanzen zeigten darüberhinaus nach dreistündiger GUS-Färbung oftmals schwache GUS-Signale in den Leitbündelzellen, die in den Kontrollpflanzen nicht zu beobachten waren (Abb. 3.18.A+B). Bei längerer Färbung (16 Stunden) war zusätzlich eine deutlich asymmetrische Verteilung der GUS-Signale bis in die Epidermis zu erkennen (Abb. 3.18.C).

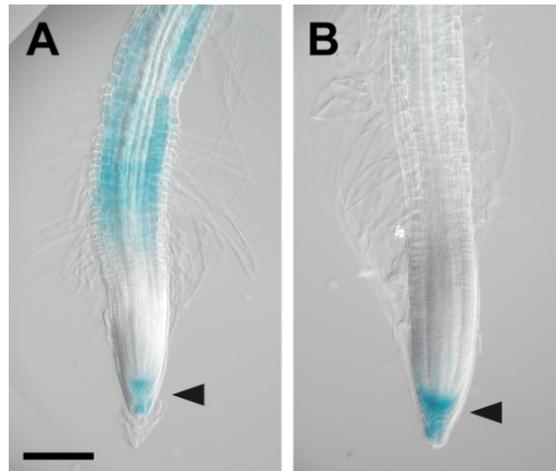


**Abbildung 3.18. *DR5::GUS*-Färbungen in älteren *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen (Linie #4).**

(A) Für 4 Tage auf Estradiol-Medium transferierte, *TaLCT1*-exprimierende Pflanzen zeigen nach dreistündiger GUS-Färbung im Gegensatz zu (B) nicht *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen verbreiterte *DR5::GUS*-Signale in den Wurzelspitzen und schwache Signale in Stelenzellen (Pfeil). (C) Längere Färbung (16 Stunden) offenbart bei *TaLCT1*-Pflanzen asymmetrisch verteilte GUS-Signale im Bereich der lateralen Wurzelhaube bis in epidermale und kortikale Zellschichten (Pfeile). Maßstab für A-C = 50 µm.

In weiteren Versuchen wurden fünf Tage alte *TaLCT1*-transformierte Pflanzen für drei Tage auf Estradiol-haltiges Medium (0,2 µM) gesetzt, um die Genexpression von *TaLCT1* zu induzieren. Dann wurden die Pflanzen für weitere 24 Stunden auf Medien mit Estradiol und 0,5 µM 1-Naphthylessigsäure (1-NAA) überführt und anschließend der GUS-Färbeprozedur unterzogen (Kpt. 2.2.4.3 & 2.2.5.1). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das synthetische Auxinderivat 1-NAA membranpermeabel ist und somit per Diffusion, unabhängig von aktivem Auxinimport (z.B. über *AUX1*), in Zellen aufgenommen wird (Delbarre *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu werden für die weitere Translokation von 1-NAA in der Pflanze aktive Auxinexportsysteme benötigt (Delbarre *et al.*, 1996; Rigas *et al.*, 2013). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten verstärkte Auxin-abhängige GUS-Signale in der Elongationszone von Wurzeln *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen (Abb. 3.19.A). In Pflanzen, in denen dagegen aufgrund der Abwesenheit von Estradiol *TaLCT1* nicht

exprimiert war, waren verstärkte GUS-Signale im Bereich des Ruhenden Zentrums sowie der Columella erkennbar (Abb. 3.19.B). Diese Signale waren wiederum in den *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen schwächer als in den Kontrollpflanzen. Diese Ergebnisse deuten auf Störungen des basipetalen Auxintransports sowie auf Defekte in der Auxinverteilung in den Wurzelspitzen *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen hin.



**Abbildung 3.19. DR5::GUS-Färbungen nach Behandlung mit exogenem Auxin.**

(A) *TaLCT1*-exprimierende *DR5::GUS*-Pflanzen (Linie #4) zeigten nach 24-stündiger Behandlung mit dem synthetischen, membranpermeablen Auxinderivat 1-NAA verstärkte GUS-Signale in der Elongationszone der Wurzeln. Dagegen waren in den Wurzelspitzen die GUS-Signale schwächer als bei (B) nicht-*TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen (Pfeilspitzen). GUS-Färbezeit: ~30 Minuten. Maßstab = 150 µm.

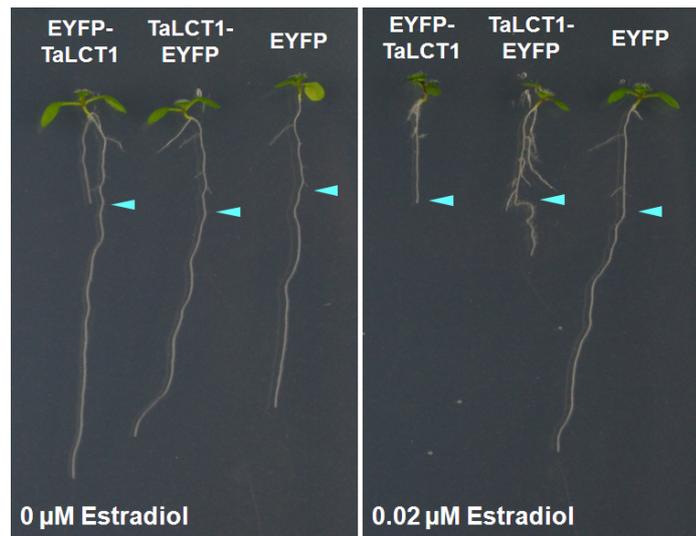
### 3.5. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1

#### 3.5.1. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in *Arabidopsis*

##### *thaliana*

Aufgrund der Ergebnisse früherer Studien mit *TaLCT1*-exprimierenden Hefezellen wurde eine subzelluläre Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran vorhergesagt (Schachtman *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 1998; Amtmann *et al.*, 2001). Basierend auf diesen Vorhersagen wurde ebenfalls für pflanzliche Zellen eine Plasmamembran-Lokalisation diskutiert (Antosiewicz & Hennig, 2004). Da diese in den bisherigen Veröffentlichungen jedoch nicht gezeigt wurde, blieb die Frage nach der tatsächlichen subzellulären Lokalisation des TaLCT1-Proteins allerdings ungewiss.

## Ergebnisse

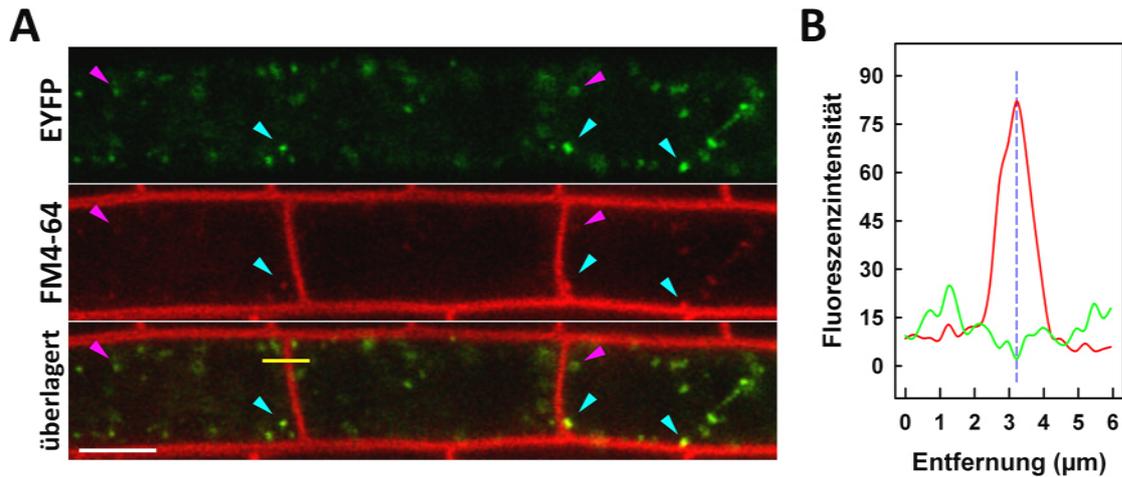


**Abbildung 3.20.** N- und C-terminale *XVE-EYFP*-Fusionskonstrukte für *TaLCT1* zeigen bei Expression in *Arabidopsis* vergleichbare Wurzelphänotypen wie Pflanzen, die unfusioniertes *TaLCT1* exprimieren.

Für den Versuch wurden fünf Tage alte Pflanzen auf neues Medium ohne und mit Estradiol (0,02  $\mu\text{M}$ ) umgesetzt und weitere vier Tage kultiviert. Blaue Pfeilspitzen markieren die Wurzellänge zum Zeitpunkt des Transfers. *XVE-EYFP*-transformierte Pflanzen dienten als Kontrolle.

Aus diesem Grund wurden für *TaLCT1* Estradiol-induzierbare N- und C-terminale *EYFP*-Fusionskonstrukte kloniert. Die resultierenden Expressionsvektoren (*pER8-XVE-TaLCT1-EYFP* und *pER8-XVE-EYFP-TaLCT1*) wurden für die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen mit der *Floral-Dip* Methode eingesetzt (Clough & Bent, 1998). Erfolgreich transformierte Pflanzen wurden mittels Hygromycin B selektiert und die Anwesenheit der korrekten Transgene im Genom mittels PCR überprüft. Pflanzen der T2-Generation zeigten bei beiden Konstrukten ähnliche Phänotypen (Abb. 3.20) wie die mit ungetaggetem *TaLCT1* transformierten Pflanzen (z.B. inhibierte Wurzelelongation oder Defekte im gravitropischen Wachstum), was auf die Funktionalität der Fusionskonstrukte hindeutet. Allerdings zeigten hier alle untersuchten Linien sehr starke Wachstumsinhibition, sodass die folgenden Versuche bei niedrigeren Estradiolkonzentrationen (0,002  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt wurden.

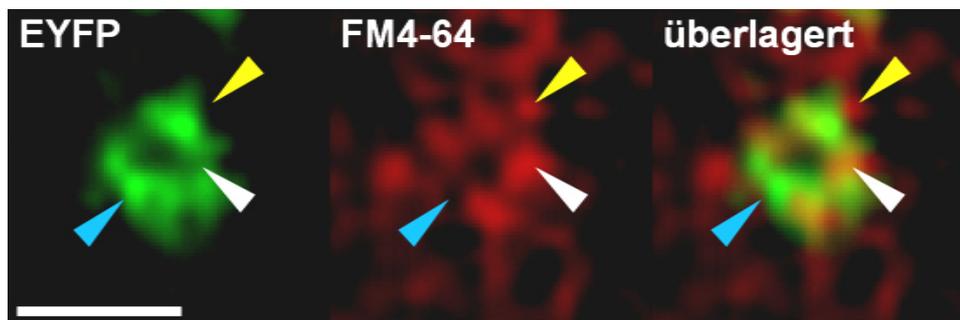
Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen dieser Pflanzen zeigten *EYFP*-fusioniertes *TaLCT1* in kleinen, sich häufig schnell bewegenden, punktförmigen Strukturen (Abb. 3.21.A). Hierbei gab es keine erkennbaren Unterschiede im Fluoreszenzmuster zwischen N- und C-terminalen *EYFP*-Fusionsproteinen.



**Abbildung 3.21. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Arabidopsis-Wurzelzellen.**

(A) EYFP-fusioniertes TaLCT1 ist in Arabidopsis-Wurzelzellen nach ein bis zwei Tagen Wachstum auf Estradiol-haltigem Medium in kleinen punktförmigen Kompartimenten lokalisiert. Diese Kompartimente sind zum Teil gut mit dem lipophilen Membranfarbstoff FM4-64 anfärbbar (hellblaue Pfeilspitzen). Andere, schwächer fluoreszierende Strukturen lassen sich dagegen nur schlecht oder gar nicht mit FM4-64 anfärben (rosa Pfeilspitzen). Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Eine Überlagerung von FM4-64-Fluoreszenz mit EYFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran war nicht beobachtbar. Das Diagramm zeigt die Intensitäten der Fluoreszenz von FM4-64 (rot) und EYFP (grün) entlang der in Abbildung A gekennzeichneten gelben Linie. Die gestrichelte Linie im Diagramm markiert das Fluoreszenzmaximum von FM4-64 in der Plasmamembran.

Eine genauere Analyse der Fluoreszenzsignale unter Zuhilfenahme des amphiphilen Farbstoffs FM4-64 zeigte darüberhinaus, dass EYFP-fusioniertes TaLCT1 sowohl in stärker fluoreszierenden, gut mit FM4-64 anfärbbaren Strukturen (Abb. 3.21.A, hellblaue Pfeilspitzen), als auch in schwächer fluoreszierenden, schlecht mit FM4-64 anfärbbaren Strukturen detektierbar war (Abb. 3.21.A, rosa Pfeilspitzen; Abb. 3.22). Eine Kollokalisierung von EYFP-Fluoreszenz mit FM4-64-Fluoreszenz in der Plasmamembran war dagegen nicht evident (Abb. 3.21.B).



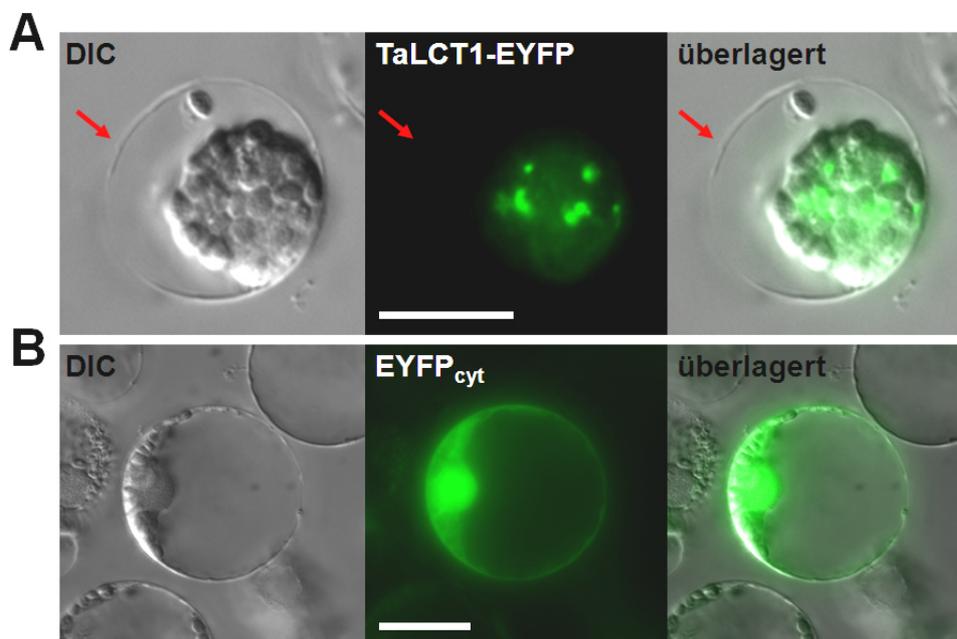
**Abbildung 3.22. Eine stärkere Vergrößerung zeigt für einige der schwächer fluoreszierenden EYFP-fusionierten TaLCT1-Kompartimente eine Ring- oder U-förmige Struktur.**

Hellblaue Pfeilspitze: Bereich, in dem EYFP-Fluoreszenz nicht mit FM4-64 überlagert; gelbe Pfeilspitze: Bereich, in dem FM4-64-Fluoreszenz nicht mit EYFP überlagert; weiße Pfeilspitze: Bereich in dem FM4-64- und EYFP-Fluoreszenz teilweise überlagern. (Zur besseren Visualisierung wurden Kontrast und Helligkeit der Abbildung für beide Kanäle gleichmäßig erhöht.) Maßstab = 1  $\mu\text{m}$ .

## 3.5.2. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Weizen-Protoplasten

Um auszuschließen, dass EYFP-fusioniertes TaLCT1 in Arabidopsis aufgrund der heterologen Expression möglicherweise anders lokalisiert als in Weizenzellen, wurde dessen Lokalisation in Protoplasten aus Weizen untersucht. Für diese Experimente wurde ein C-terminales *EYFP*-Fusionskonstrukt, reguliert durch einen konstitutiv aktiven 35S-Promoter, kloniert. Als Kontrolle wurde das gleiche Konstrukt ohne *TaLCT1* (d.h. cytosolisches EYFP) eingesetzt (Abb. 3.23.B). In mikroskopischen Untersuchungen der transformierten Weizen-Protoplasten konnte ein ähnliches Fluoreszenzmuster von TaLCT1-EYFP in punktförmigen, cytosolischen Kompartimenten beobachtet werden wie in Arabidopsis. Eine Lokalisation in der Plasmamembran war dagegen auch in diesen Zellen nicht erkennbar (Abb. 3.23.A, Pfeil).

Zur genaueren Aufklärung der Lokalisation von TaLCT1 war die Koexpression von *TaLCT1-EYFP* mit Markergenen für verschiedene zelluläre Kompartimente in Weizen-Protoplasten geplant. Die Transformationseffizienz in Versuchen mit *TaLCT1-EYFP* war jedoch sehr niedrig, sodass diese Methode für Koexpressionsanalysen ungeeignet war.

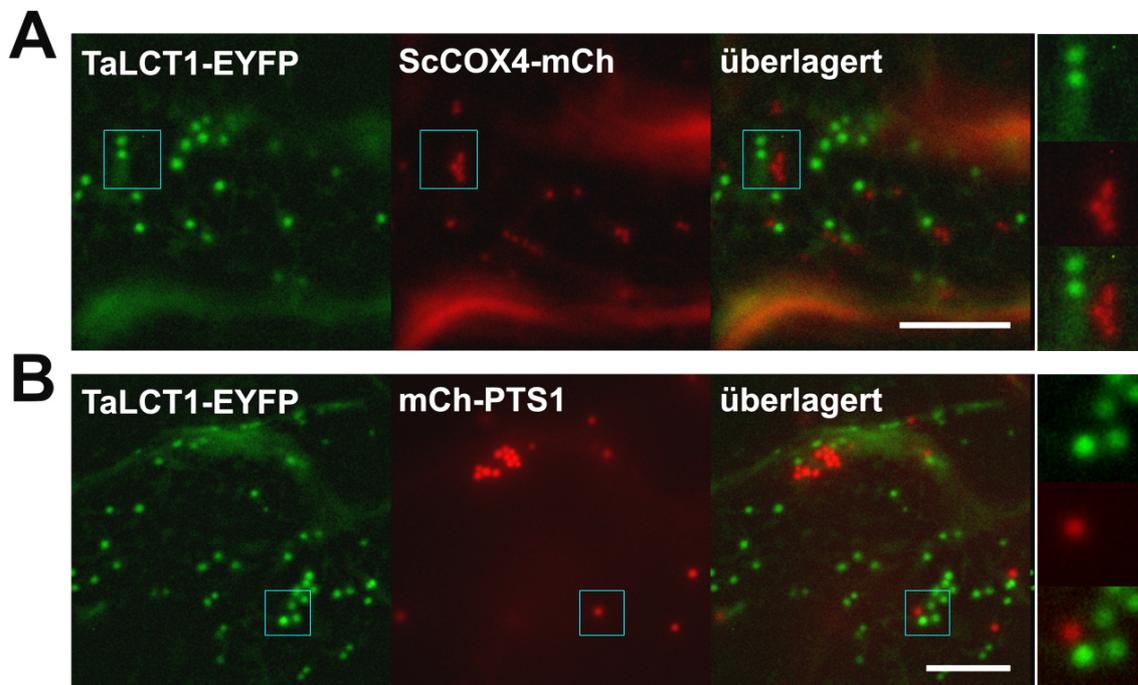


**Abbildung 3.23. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Weizenzellen.**

(A) In Weizen-Protoplasten ist transient exprimiertes, EYFP-fusioniertes TaLCT1 in punktförmigen Strukturen lokalisiert. EYFP-Fluoreszenz in der Plasmamembran der Zellen ist nicht erkennbar (Pfeil). (B) Ein Plasmid für die Expression von cytosolischem EYFP ( $EYFP_{cyt}$ ) diente in parallel durchgeführten Versuchen als Kontrolle für die Protoplastentransformation. Maßstab für A und B = 20  $\mu\text{m}$ .

## 3.5.3. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Tabakzellen

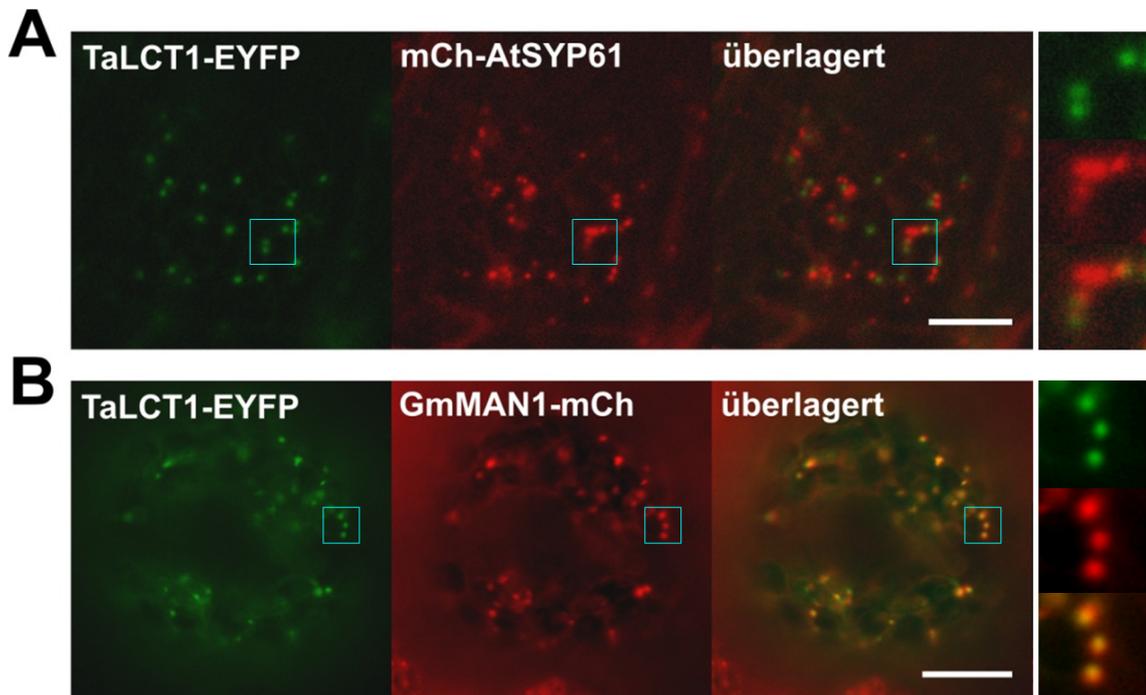
Alternativ zur Expression in Weizen-Protoplasten wurde die Methode der transienten Genexpression in *Nicotiana benthamiana*-Blättern durch Infiltration mit *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt (Kpt. 2.2.2.2). Auch hier waren ein bis zwei Tage nach Infiltration Fluoreszenzmuster von TaLCT1-EYFP in punktförmigen Strukturen zu erkennen, die mit denen in Arabidopsis-Wurzelzellen und Weizen-Protoplasten vergleichbar waren. Die Koexpression mit verschiedenen *mCherry*-fusionierten Markergenen (Nelson *et al.*, 2007) zeigte darüberhinaus keine Kolokalisation von TaLCT1-EYFP mit Markern für Peroxisomen (mCherry-PTS1) oder Mitochondrien (ScCOX4-mCherry) (Abb. 3.24).



**Abbildung 3.24.** Transiente Koexpression von *TaLCT1-EYFP* mit *mCherry*-fusionierten Markergenen für Mitochondrien und Peroxisomen in Tabakzellen (24 Stunden nach Agrobakterien-Infiltration).

TaLCT1-EYFP zeigt keine Kolokalisation mit Markern für (A) Mitochondrien (ScCOX4; Fragment der Cytochrom c Oxidase (Untereinheit 4) aus Hefe) und (B) Peroxisomen (PTS1; peroxisomal targeting signal 1 (Ser-Lys-Leu)). Maßstab = 10  $\mu$ m. Die Bildfolgen rechts zeigen eine Vergrößerung der hellblau eingerahmten Ausschnitte.

Eine partielle Kolokalisation war mit dem *Trans-Golgi-Netzwerk* (TGN)-Marker mCherry-AtSYP61 zu erkennen (Abb. 3.25.A). Die größte Übereinstimmung im Fluoreszenzmuster von TaLCT1-EYFP konnte allerdings mit den Signalen von GmMAN1-mCherry, einem häufig verwendeten Marker für pflanzliche Golgi-Stapel, beobachtet werden (Abb. 3.25.B).



**Abbildung 3.25. Transiente Koexpression von *TaLCT1-EYFP* mit *mCherry*-fusionierten Markergenen für Golgi und Trans-Golgi-Netzwerk in Tabakzellen (24 Stunden nach Agrobakterien-Infiltration).**

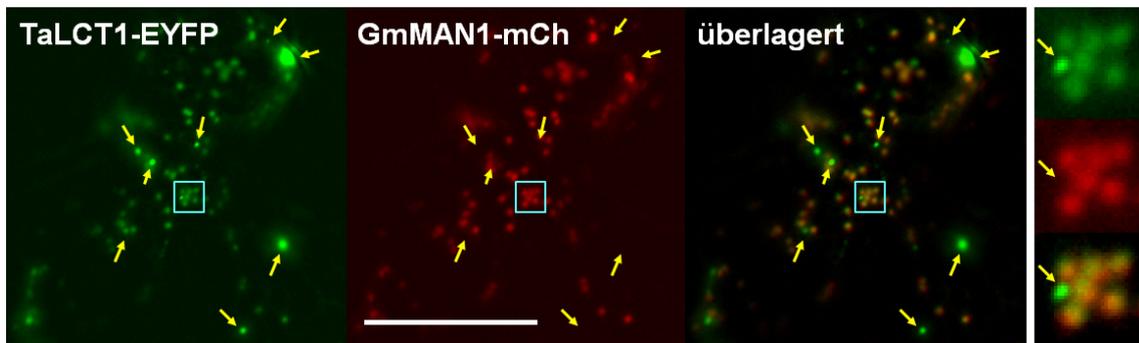
*TaLCT1-EYFP* zeigt (A) partielle Kolokalisation und räumliche Nähe mit dem *Trans-Golgi-Netzwerk*-Marker *mCherry-AtSYP61* (Syntaxin of Plants 61 aus *A. thaliana*) und (B) erhebliche Kolokalisation mit dem Golgi-Marker *GmMAN1-mCherry* (Fragment der Alpha-1,2-Mannosidase 1 aus der Sojabohne). Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ . Die Bildfolgen rechts zeigen eine Vergrößerung der hellblau eingerahmten Ausschnitte.

### 3.5.4. Veränderungen der subzellulären Lokalisation

Während ein bis zwei Tage nach der Infiltration des Tabakgewebes mit den Agrobakterien *EYFP*-fusioniertes *TaLCT1* mit dem Golgi-Marker *GmMAN1-mCherry* kolokalisierte, änderte sich dieses Bild im weiteren Verlauf der Genexpression. Zwei bis drei Tage nach der Infiltration waren neben den relativ schwach fluoreszierenden Golgi-Stapeln vermehrt weitere punktförmige Strukturen zu erkennen, die in Größe und Motilität variierten. Diese meist stärker fluoreszierenden Strukturen zeigten nun eine deutlich geringere Signalüberlagerung mit dem Golgi-Marker *GmMAN1-mCherry* (Abb. 3.26, Pfeile).

Vereinzelt konnte direkt beobachtet werden, dass die kleineren Strukturen durch Aggregation (und/oder möglicherweise Fusion) größere und hellere Strukturen mit einem mittleren Durchmesser von  $3,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$  ( $n = 60$ ) bildeten. Diese Vorgänge liefen zeitlich meist recht schnell (innerhalb weniger Sekunden) ab.

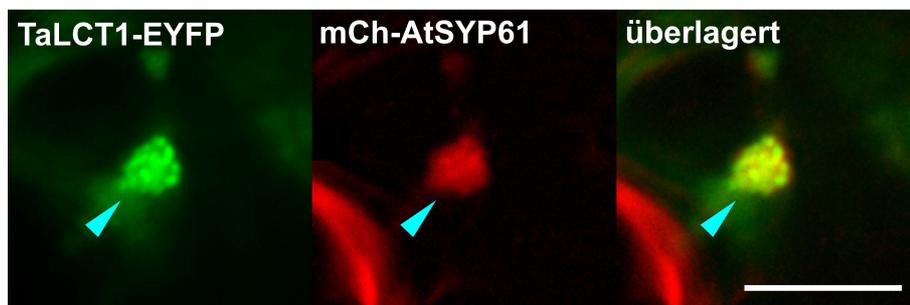
## Ergebnisse



**Abbildung 3.26. Transiente Koexpression von *TaLCT1-EYFP* mit dem *mCherry*-fusionierten Golgi-Marker *GmMAN1* in Tabakzellen (3 Tage nach Agrobakterien-Infiltration).**

*TaLCT1-EYFP* ist neben schwächer fluoreszierenden Golgi-Stapeln auch in stärker fluoreszierenden punktförmigen Strukturen erkennbar. Diese Strukturen zeigen nur schwache oder keine Kolo­kalisierung mit dem Golgi-Marker *GmMAN1-mCherry* (Pfeile). Maßstab = 20  $\mu\text{m}$ . Die Bildfolge rechts zeigt eine Vergrößerung des hellblau eingerahmten Ausschnitts.

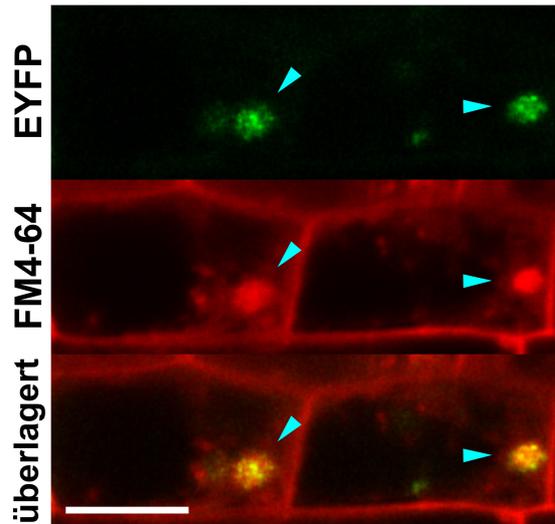
Der Prozess gipfelte nach 5 bis 6 Tagen in einer drastischen Reduktion der Zahl kleinerer, fluoreszierender Punkte zugunsten einiger weniger vergrößerter und aggregierter Strukturen pro Zelle, die nun wiederum vermehrt mit dem TGN-Marker *mCherry-AtSYP61* kolo­kalisieren (Abb. 3.27). Zu diesem Zeitpunkt waren dann auch bereits erste deutlich nekrotische Stellen an den infiltrierten Blattbereichen zu erkennen (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.27. Transiente Koexpression von *TaLCT1-EYFP* mit dem *mCherry*-fusionierten TGN-Marker *AtSYP61* in Tabakzellen (5 Tage nach Agrobakterien-Infiltration).**

*TaLCT1-EYFP*-tragende Kompartimente bilden vergrößerte, aggregierte Strukturen in den Zellen (Pfeilspitze), die mit dem *Trans-Golgi-Netzwerk*-Marker *mCherry-AtSYP61* kolo­kalisieren. Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ .

Eine vergleichbare Bildung von aggregierten Strukturen, die auch mit FM4-64 anfärbbar waren (FM4-64-Färbung: ~90 Minuten), konnte auch in Wurzelzellen *EYFP-TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen nach mehrtägigem Wachstum auf Estradiol-Medium beobachtet werden (Abb. 3.28).

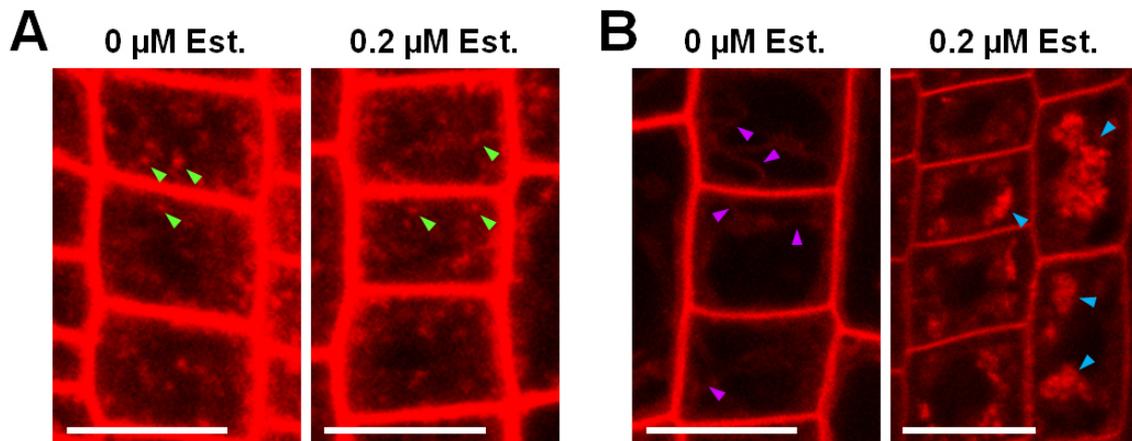


**Abbildung 3.28.** Bei 3- bis 4-tägigem Wachstum auf Estradiol-haltigem Medium ist in Pflanzen, die *EYFP*-fusioniertes *TaLCT1* exprimieren, eine verstärkte Bildung von fluoreszierenden, mit FM4-64 anfärbbaren Aggregaten in Zellen zu beobachten (Pfeilspitzen).

Maßstab = 10  $\mu$ m.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei Pflanzen beobachtet werden, die unfusioniertes *TaLCT1* exprimieren. Für diese Versuche wurden fünf Tage alte *XVE-TaLCT1*-Pflanzen (Linie #4) für vier weitere Tage auf frische  $\frac{1}{2}$  MS-Medien ohne und mit Estradiol (0,2  $\mu$ M) transferiert. Die Pflanzen wurden anschließend mit 5  $\mu$ M FM4-64 gefärbt und zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopiert. In zahlreichen früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der lipophile Membranfarbstoff FM4-64 über Endocytose internalisiert wird und sich im weiteren Verlauf in vakuolären Membranen anreichert (Bolte *et al.*, 2004).

Nach 15 Minuten konnte sowohl in den Wurzelzellen *TaLCT1*-exprimierender als auch in denen nicht *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen eine Wanderung von FM4-64 aus der Plasmamembran in kleine, punktförmige Vesikel beobachtet werden (Abb. 3.29.A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass frühe endocytotische Prozesse in *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen nicht gestört sind. Nach etwa 90 Minuten konnte in den Wurzelzellen nicht *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen eine beginnende Anreicherung des Farbstoffs in vakuolären Membranen beobachtet werden (Abb. 3.29.B, lila Pfeilspitzen). In den Zellen *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen war dagegen zum gleichen Zeitpunkt die Färbung vakuolärer Membranen deutlich geringer. Dafür war eine verstärkte Akkumulation von FM4-64 in aggregierten, intrazellulären Strukturen zu erkennen (Abb. 3.29.B, blaue Pfeilspitzen).



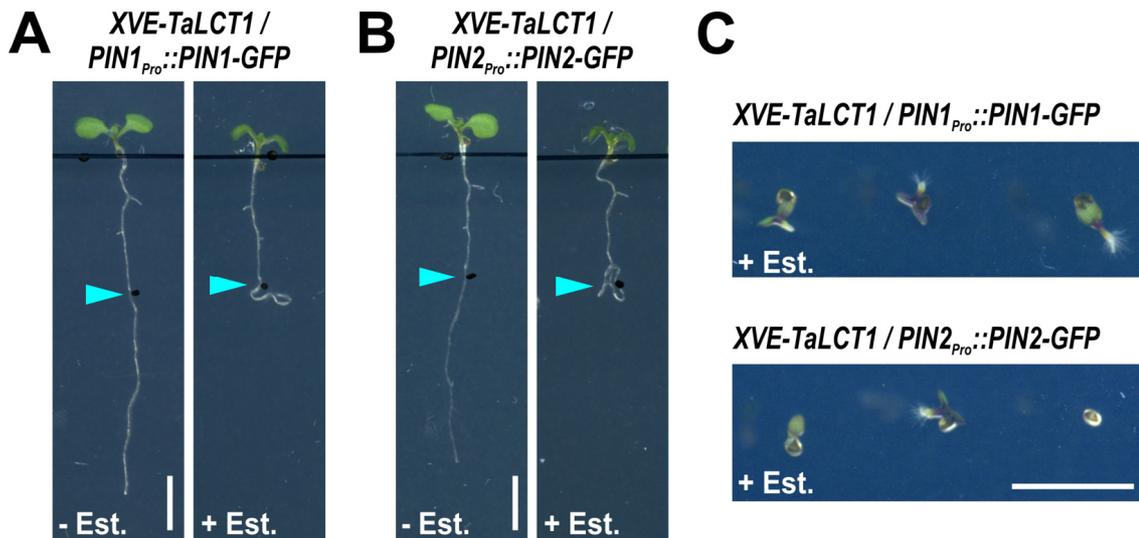
**Abbildung 3.29. Untersuchung der Internalisierung von FM4-64 in Wurzelzellen *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen.**

(A) Sowohl in den Wurzelzellen *TaLCT1*-exprimierender als auch nicht *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen konnte nach 15-minütiger Färbung eine Internalisierung des Membranfarbstoffs FM4-64 durch Endosomen beobachtet werden (grüne Pfeilspitzen). (B) Nach 90-minütiger Färbung war in nicht *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen eine beginnende Anreicherung des Farbstoffs in vakuolären Membranen erkennbar (violette Pfeilspitzen). Dies war in den Zellen *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen wiederum deutlich reduziert. Dagegen konnte eine verstärkte Akkumulation von FM4-64 in intrazellulären Aggregaten beobachtet werden (blaue Pfeilspitzen). Maßstab für A und B = 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.6. Verteilung und Lokalisation von Auxin-Effluxtransportern in *TaLCT1*-exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen

Wie zuvor beschrieben, konnte in Versuchen mit *DR5::GUS*-Pflanzen gezeigt werden, dass es infolge der Expression von *TaLCT1* zu Störungen im polaren Auxintransport in Wurzeln kommt (Kpt. 3.4). Desweiteren deuten die Ergebnisse aus den Versuchen mit EYFP-fusioniertem *TaLCT1* auf Defekte beim Membrantransport oder der Proteinsortierung hin. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Veränderungen im polaren Auxintransport möglicherweise durch einen störenden Einfluss von *TaLCT1* auf die polare Lokalisation bestimmter Auxintransporter erklärt werden könnte.

Zur Aufklärung dieser Frage wurden *XVE-TaLCT1*-Pflanzen der Linien #4 und #7 mit Reporter-Gen-Pflanzen gekreuzt, die *GFP*-fusionierte Versionen der Gene *PIN1* und *PIN2*, reguliert durch ihre entsprechenden nativen Promotoren, exprimieren (Quelle: Prof. Dr. Ingo Heilmann, Zelluläre Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Die aus diesen Kreuzungen resultierenden Pflanzen zeigten zu den parentalen *XVE-TaLCT1*-Linien vergleichbare Defekte im Wurzelwachstum und der frühen Keimlingsentwicklung (Abb. 3.30; gezeigt für Linie #4).

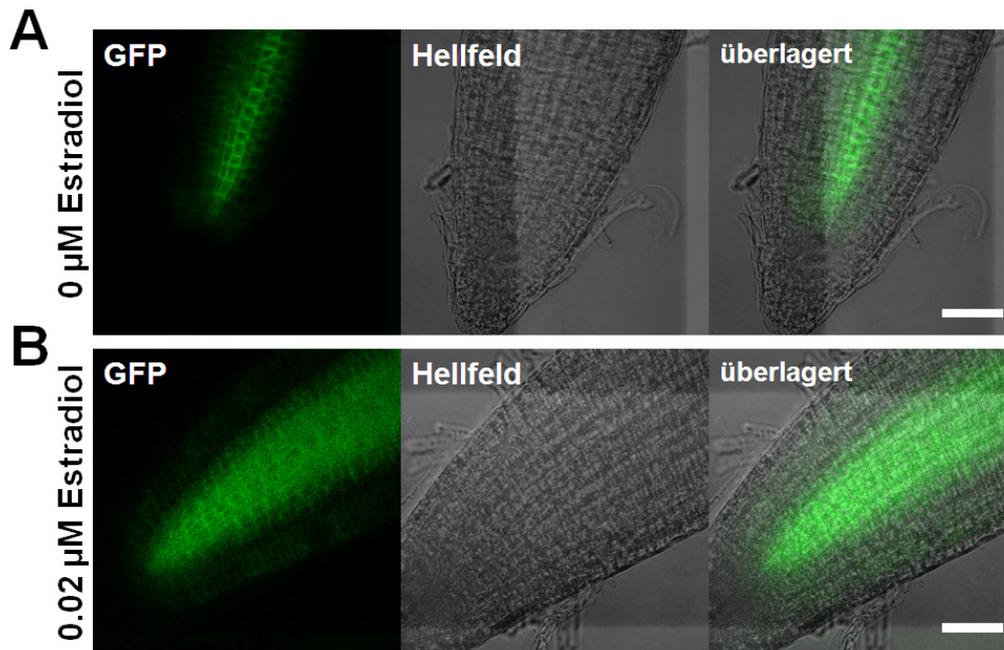


**Abbildung 3.30.** *XVE-TaLCT1 / PIN1<sub>Pro</sub>::PIN1-GFP*- und *XVE-TaLCT1 / PIN2<sub>Pro</sub>::PIN2-GFP*-Pflanzen zeigen Phänotypen wie die parental *XVE-TaLCT1*-Linien.

(**A+B**) Fünf Tage alte, auf Estradiol-freiem ½ MS-Medium vorkultivierte Pflanzen wurden für zwei weitere Tage auf neue, Estradiol-freie und Estradiol-haltige Medien (0,02 µM Estradiol) umgesetzt. Blaue Pfeilspitzen markieren die Wurzellänge zum Zeitpunkt des Transfers. (**C**) Phänotypen von *XVE-TaLCT1 / PIN1<sub>Pro</sub>::PIN1-GFP*- und *XVE-TaLCT1 / PIN2<sub>Pro</sub>::PIN2-GFP*-Keimlingen, die 5 Tage auf ½ MS-Medium mit 1 µM Estradiol gekeimt und gewachsen sind. Maßstab jeweils 5 mm.

Die Untersuchung von Pflanzen, die von Estradiol-freiem auf Estradiol-haltiges Medium überführt wurden, mithilfe konfokaler Mikroskopie zeigte sowohl bei *TaLCT1*-exprimierenden als auch bei nicht *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen deutliche PIN1-GFP-Signale hauptsächlich in den Stelen der Wurzeln (Abb. 3.31). Die Fluoreszenzintensität war in beiden Fällen vergleichbar, so dass relevante Unterschiede in der Expressionsstärke von *PIN1* ausgeschlossen werden konnten.

In Leitbündelzellen von Wildtyp-Pflanzen ist PIN1 polar an den basalen Seiten der Plasmamembranen lokalisiert (Gälweiler *et al.*, 1998). In etwa 30% der Pflanzen (n = 15), in denen die Expression von *TaLCT1* mit Estradiol induziert war, erschienen die Fluoreszenzsignale von GFP-fusioniertem PIN1 in den Leitbündeln jedoch diffus und weniger deutlich in den Plasmamembranen lokalisiert als in Pflanzen, die *TaLCT1* nicht exprimierten (Abb. 3.31).



**Abbildung 3.31. *TaLCT1*-exprimierende Pflanzen zeigen teilweise eine gestörte polare Lokalisation des GFP-fusionierten Auxintransporters PIN1.**

(A) Fünf Tage alte *XVE-TaLCT1*-Pflanzen, die für weitere vier Tage auf Estradiol-freiem Medium wuchsen, zeigen PIN1-GFP Lokalisation in der basalen Plasmamembran von Zellen der Wurzelstele. (B) Dagegen ist die PIN1-GFP-Fluoreszenz in einem Teil der *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen diffus und deutlich weniger prominent in den Plasmamembranen.

Der Auxin-Effluxcarrier PIN2 ist als ein wichtiger Regulator des gravitropischen Wachstums der Wurzel beschrieben (Luschig *et al.*, 1998; Abas *et al.*, 2006). Das Protein ist, im Gegensatz zu PIN1, vor allem apikal in den Zellmembranen der lateralen Wurzelhaube sowie der Epidermis lokalisiert, wo es den Auxinfluss von der Wurzelspitze in die Elongationszone reguliert (Feraru & Friml, 2008). Dieses in der Literatur beschriebene Lokalisationsmuster von PIN2 konnte sowohl in *TaLCT1*-exprimierenden als auch in nicht *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen beobachtet werden. Die mikroskopischen Analysen *PIN2-GFP*-exprimierender Pflanzen zeigten auch keinen visuell erkennbaren Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen *TaLCT1*-exprimierenden und nicht *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen. Somit können unterschiedliche *PIN2*-Expressionsstärken als Ursache für die beobachteten Phänotypen ausgeschlossen werden.

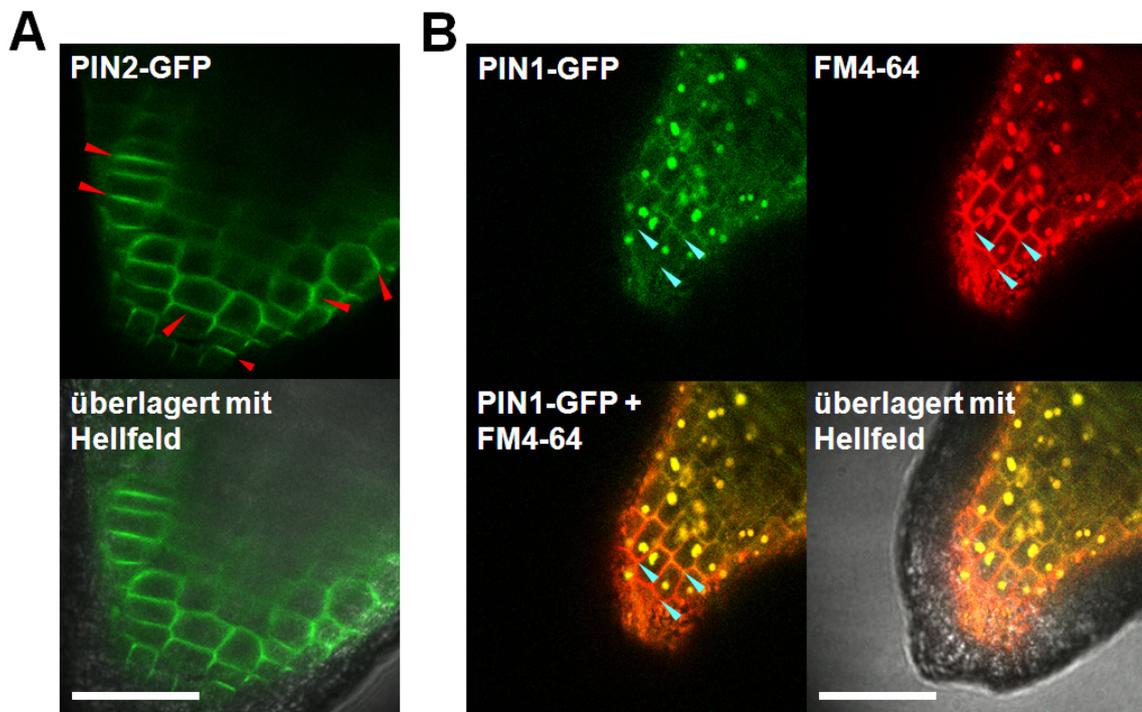
### 3.6.1. Untersuchung der PIN-Lokalisation während der frühen Keimlingsentwicklung

Weiterhin wurde die Verteilung und Lokalisation der GFP-fusionierten PIN1- und PIN2-Proteine in 5 Tage alten, auf Estradiol-haltigem Medium gekeimten und gewachsenen Keimlingen untersucht, die die zuvor beschriebenen durch *TaLCT1*

## Ergebnisse

verursachten Wachstumsdefekte (Abb. 3.7) aufwiesen. Auch wenn das Zellmuster in diesen Pflanzen schwer mit jenem in gleichalten Wildtyp-Pflanzen vergleichbar ist, war auch hier eine apikale Lokalisation von PIN2-GFP in Zellmembranen erkennbar (Abb. 3.32.A).

Ein anderes Bild ergab sich dagegen bei der Analyse der *PIN1-GFP*-exprimierenden Keimlinge der Gruppe 1. Die Plasmamembran-Lokalisation von PIN1-GFP war in diesen Pflanzen drastisch reduziert oder zum Teil gar nicht detektierbar. Stattdessen waren starke Fluoreszenzsignale in intrazellulären Strukturen erkennbar. Weitere Versuche mit FM4-64 zeigten darüberhinaus, dass auch diese Strukturen durch den Membranfarbstoff angefärbt werden können (Abb. 3.32.B). Auch in Keimlingen der Gruppe 2 und 3 konnten aggregierte fluoreszierende Strukturen beobachtet werden, jedoch mit geringerer Häufigkeit.



**Abbildung 3.32. Subzelluläre Lokalisation von PIN-Transportern in jungen *TaLCT1*-exprimierenden Keimlingen.**

(A) 5 Tage alte auf Estradiol-haltigem Medium gekeimte und gewachsene *XVE-TaLCT1*-Keimlinge weisen keine auffällig veränderte polare Lokalisation des Auxin-Effluxtransporters PIN2 auf. Das GFP-Fusionsprotein ist apikal in Membranen von Zellen der Wurzelhaube und Epidermis lokalisiert (Pfeilspitzen). (B) *TaLCT1*-exprimierende Keimlinge mit vergleichbaren Defekten zeigen ein auffällig verändertes Fluoreszenzmuster von PIN1-GFP. Starke Fluoreszenz ist in intrazellulären Strukturen detektierbar. Diese Strukturen konnten mit dem Membranfarbstoff FM4-64 angefärbt werden (Färbezeit: 60-90 Minuten). Die Lokalisation des Fusionsproteins in den Plasmamembranen ist dagegen reduziert (Pfeilspitzen: deutlich mit FM4-64 markierte Membranen zeigen kein oder nur schwache Signale für PIN1-GFP). Maßstab für A und B = 50  $\mu\text{m}$ .

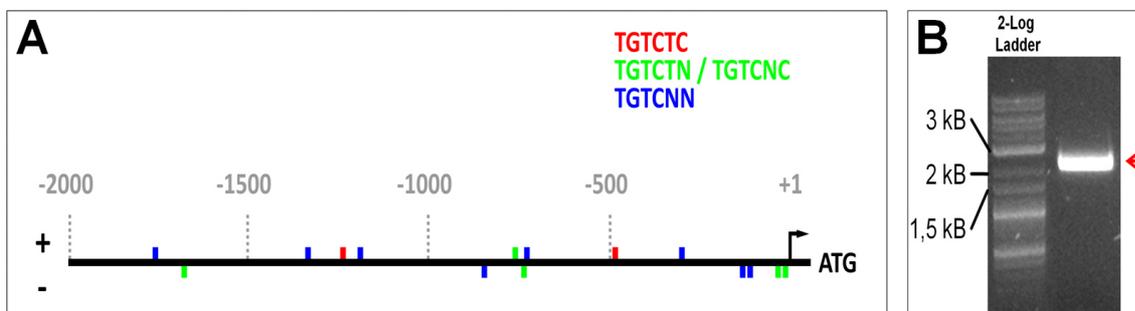
## 3.7. *In silico*-Analyse der putativen *TaLCT1*-Promotorregion aus Weizen

Die Expression vieler Gene, die an der Aufrechterhaltung der Auxin-Homöostase beteiligt sind, wird wiederum selbst durch Auxin-regulierte Transkriptionsfaktoren, s.g. *Auxin Response Factors* (ARFs), gesteuert (siehe Kpt. 1.4.3). Die Promotorregionen solcher „Auxin-induzierter“ Gene zeichnen sich häufig durch die Präsenz bestimmter Sequenzen, s.g. *Auxin Responsive Elements* (AuxREs) aus, an die die ARF-Transkriptionsfaktoren binden können. AuxREs bestehen häufig aus der Basensequenz *TGTCTC* oder degenerierten Varianten (*TGTCNN*), die sowohl in Plus- als auch Minus-Richtung im Promotor vorliegen können (Mironova *et al.*, 2014).

Da sich in den vorangegangenen Versuchen ein möglicher Zusammenhang zwischen *TaLCT1* und dem Transport, bzw. der Regulation des Transports von Auxin in Arabidopsis ergab, stellte sich die Frage, ob das Protein möglicherweise auch in Weizen in ähnliche Prozesse involviert sein könnte. Einen möglichen Hinweis dafür, könnte das Vorhandensein von AuxREs in der Promotorregion des Gens liefern.

Um dies zu überprüfen wurde eine etwa 2 kB-große Gensequenz 5'-stromaufwärts des *TaLCT1*-Startcodons aus der *CerealsDB / Wheat Genomic Sequence* Datenbank (Kpt. 2.1.10) herausgesucht (Abb. 3.33.A & Anhang Abb. 8.1). Zur Verifizierung der Sequenz aus der Datenbank wurde diese mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Kpt. 2.2.1.5) unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer *TaLCT1prmF3\_SbfI* und *TaLCT1promR\_Hind* (Kpt. 2.1.6) aus *Chinese Spring* Weizen-DNA amplifiziert (Abb. 3.33.B) und ansequenziert (Kpt. 2.2.1.7).

Wie sich bei der anschließenden *in silico*-Analyse herausstellte, finden sich in dieser Region 15 putative AuxREs, 8 in Plus- und 7 in Minus-Richtung (Abb. 3.33.A). Davon befinden sich wiederum 6 innerhalb der ersten 500 und 10 innerhalb der ersten 1000 5'-stromaufwärts vom Startcodon gelegenen Basenpaare.



**Abbildung 3.33. *in silico*-Analyse der putativen *TaLCT1*-Promotorregion aus Weizen**  
**(A)** Schematische Darstellung der 2 kB-großen 5'-stromaufwärts gelegenen putativen *TaLCT1*-Promotorregion aus Weizen. Die farbigen Markierungen kennzeichnen putative AuxREs. (+1 = Transkriptionsstart; ATG = Startcodon). **(B)** Amplifikation der putativen Promotorregion aus Weizen-DNA. Als DNA-Größenstandard wurde 2-Log Ladder (New England Biolabs, Ipswich, GB) eingesetzt. Das mit einem Pfeil markierte DNA-Fragment wurde zur weiteren Kontrolle aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und ansequenziert.

### 3.8. Heterologe Expression von *TaLCT1* in Hefe

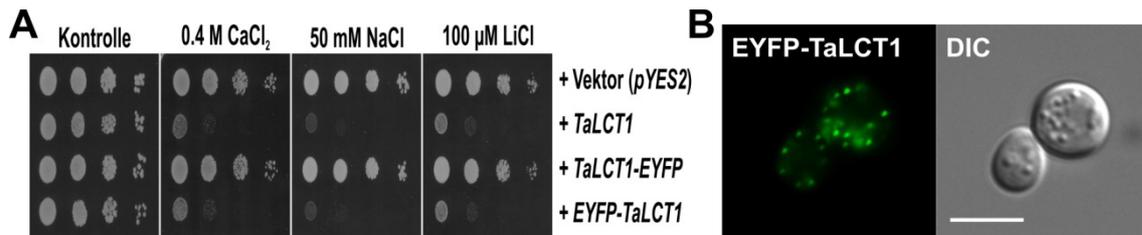
#### 3.8.1. Subzelluläre Lokalisation von *TaLCT1* in Hefezellen

Es stellte sich die Frage, wie die in *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen beobachteten Effekte mit den zuvor beschriebenen Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender Hefen in Einklang zu bringen sind. Die aus diesen Studien gewonnenen Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass *TaLCT1* in der Plasmamembran der Hefezellen lokalisiert ist und dort den Import bestimmter Kationen, wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Li}^+$  vermittelt (Clemens *et al.*, 1998; Amtmann *et al.*, 2001). Die subzelluläre Lokalisation des *TaLCT1*-Proteins wurde bisher jedoch nicht gezeigt.

Zur Klärung dieser Frage wurden N- und C-terminale *EYFP*-Fusionskonstrukte für *TaLCT1* hergestellt. Als Basis für die Klonierungen diente hierfür der bereits in früheren Studien verwendete Galaktose-induzierbare Expressionsvektor *pYES2* (Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA), der transformierten Hefen durch das *URA3*-Gen das Wachstum in Urazil-freien Kulturmedien ermöglicht. Die klonierten Plasmidkonstrukte wurden wiederum zur Transformation des ebenfalls in früheren Studien verwendeten Hefestamms G19 genutzt (Quintero *et al.*, 1996; Amtmann *et al.*, 2001). Die erhöhte Sensitivität dieses Hefestammes gegenüber  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$  beruht auf der Deletion der *ENA* Gene 1 bis 4, die für Plasmamembran-lokalisierete  $\text{Na}^+$ -ATPasen kodieren (Haro *et al.*, 1991; Quintero *et al.*, 1996). Diese wiederum repräsentieren einen der Hauptentgiftungsmechanismen für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$  in Hefen (Ariño *et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass durch die heterologe Expression von *TaLCT1* die Sensitivität dieses Hefestammes gegenüber  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$ , aber auch  $\text{Ca}^{2+}$ , weiter erhöht wird (Amtmann *et al.*, 2001).

Um die Funktionalität der Fusionskonstrukte zu überprüfen, wurden die transformierten G19-Zellen für *Drop-Assay* Analysen verwendet. Als Kontrolle dienten in diesen Experimenten G19-Zellen, die mit dem ungetaggten *pYES2-TaLCT1*-Plasmid transformiert wurden (Quelle: Anna Amtmann). Zur Induktion der Genexpression wurde bei der Herstellung der Kulturmedien Galaktose statt Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigten die vorherigen Beobachtungen erhöhter Sensitivität der *TaLCT1*-exprimierenden Hefen gegenüber  $\text{NaCl}$ ,  $\text{LiCl}$  und  $\text{CaCl}_2$ . Des weiteren zeigte sich, dass mit dem N-terminalen *EYFP*-Fusionskonstrukt transformierte Hefezellen vergleichbar im Wachstum auf erhöhten Salzkonzentrationen gehemmt waren (Abb. 3.34.A). Das C-terminale Fusionskonstrukt konnte dagegen keine Hypersensitivität der Hefezellen hervorrufen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.34. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Hefe.**

(A) N-terminal EYFP-fusioniertes *TaLCT1* ist in der Lage, vergleichbar mit unfusioniertem *TaLCT1*, in G19-Hefezellen erhöhte Sensitivität gegenüber  $\text{CaCl}_2$ , NaCl und LiCl zu induzieren. (B) Diese Hefen zeigen eine Lokalisation von EYFP-TaLCT1 in cytosolischen, punktförmigen Kompartimenten. Maßstab = 5 µm.

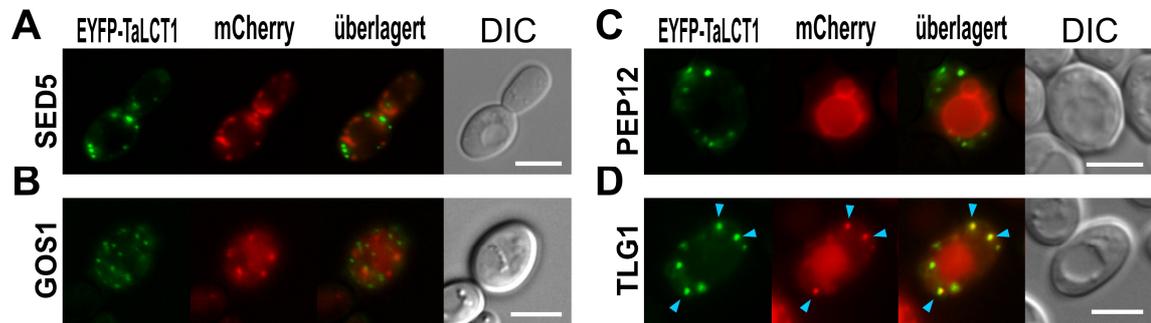
Die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte in den Hefen eine subzelluläre Lokalisation des EYFP-TaLCT1-Proteins in kleinen punktförmigen cytosolischen Strukturen (Abb. 3.34.B). Eine Lokalisation in der Plasmamembran konnte auch hier nicht beobachtet werden. Zellen, die im Gegensatz dazu mit dem nicht funktionalen *pYES2-TaLCT1-EYFP*-Plasmid transformiert waren, zeigten keine Fluoreszenzsignale.

### 3.8.2. Kolokalisationsanalysen von TaLCT1 in Hefezellen

Für Kolokalisationsanalysen wurde zunächst ein auf dem Hefeexpressionsvektor *pJR1138* (Rodríguez-Concepción *et al.*, 1999) basierendes Plasmid kloniert, welches die Fusion von Markergenen mit dem rotfluoreszierenden Reportergen *mCherry* erlaubte. Das Plasmid ermöglicht die Genexpression über einen konstitutiv aktiven *GPD1*-Promoter (*Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase*) sowie die Selektion transformierter Hefen über leucinfreie Kulturmedien, vermittelt durch das Auxotrophiemarkergen *LEU2*. Damit war es möglich, Hefen, die sowohl das *pYES2-EYFP-TaLCT1*-Plasmid, als auch die *pJR1138-mCherry*-Markergenkonstrukte trugen, mittels Urazil- und Leucin-freier Kulturmedien zu selektieren.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse mit Pflanzen, die eine subzelluläre Lokalisation von EYFP-fusioniertem TaLCT1 in Golgi-assoziierten Endomembranen zeigten, wurden für die Koexpressionsanalyse in der Hefe gezielt Markergene für solche Kompartimente gewählt. In mikroskopischen Untersuchungen zeigte sich keine Kolokalisation zwischen EYFP-TaLCT1 und dem *cis*-Golgi-Marker mCherry-SED5 (Hardwick & Pelham, 1992) sowie dem *mid*-Golgi-Marker mCherry-GOS1 (Mc New *et al.*, 1998). Des Weiteren zeigte sich auch keine Kolokalisation mit mCherry-PEP12 (Becherer *et al.*, 1996), einem Marker für späte Endosomen (LE) und prävakuoläre Kompartimente (PVC) (Abb. 3.35.A-C). Eine partielle Kolokalisation konnte dagegen mit mCherry-TLG1 (Holthuis *et al.*, 1998a), einem Marker für trans-Golgi/TGN und frühe Endosomen (EE), beobachtet werden (Abb. 3.35.D). Diese Ergebnisse deuten

somit an, dass EYFP-fusioniertes TaLCT1 auch in Hefe zumindest teilweise in diesem Endomembrankompartiment zu finden ist.

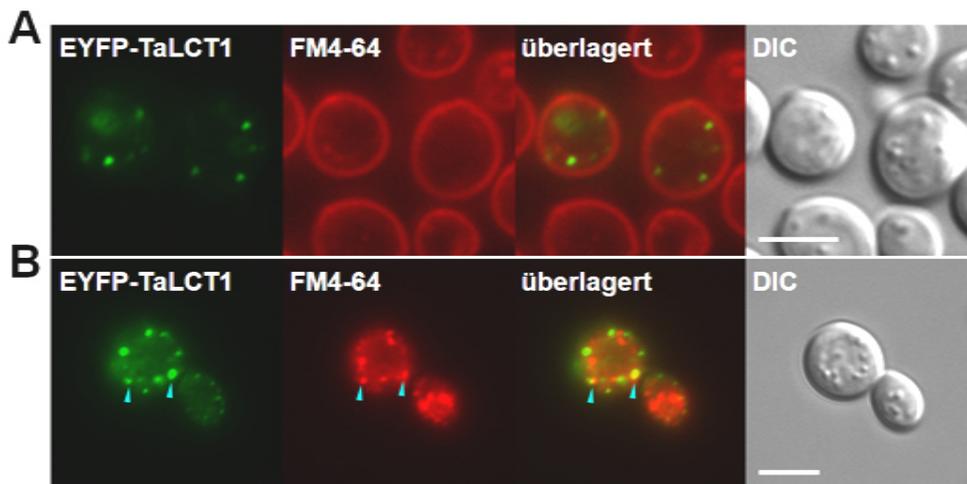


**Abbildung 3.35. Kolokalisationsanalysen in transformierten Hefezellen.**

(A) EYFP-fusioniertes TaLCT1 zeigt in transformierten G19-Hefen keine Kolokalisation mit mCherry-SED5 oder (B) mCherry-GOS1, Markern für den frühen oder mittleren Golgi-Apparat. (C) Auch mit mCherry-PEP12, einem Marker für späte Endosomen und prävakuoläre Kompartimente, konnte keine signifikante Überlagerung festgestellt werden. (D) Dagegen zeigte mCherry-TLG1 eine partielle Kolokalisation mit EYFP-TaLCT1 (Pfeilspitzen). Maßstab für A bis D = 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.8.3. Versuche mit FM4-64 in Hefezellen

Da vorangegangene Experimente mit *TaLCT1*-exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen auf Störungen von Transportvorgängen zur Vakuole hindeuten (Abb. 3.29.B), wurden weitere Experimente mit dem Farbstoff FM4-64 an *EYFP-TaLCT1*-transformierten G19-Hefezellen durchgeführt. Als Kontrollen dienten in diesen Versuchen G19-Hefezellen, die cytosolisches *EYFP* (*EYFP<sub>cyt</sub>*) exprimieren.



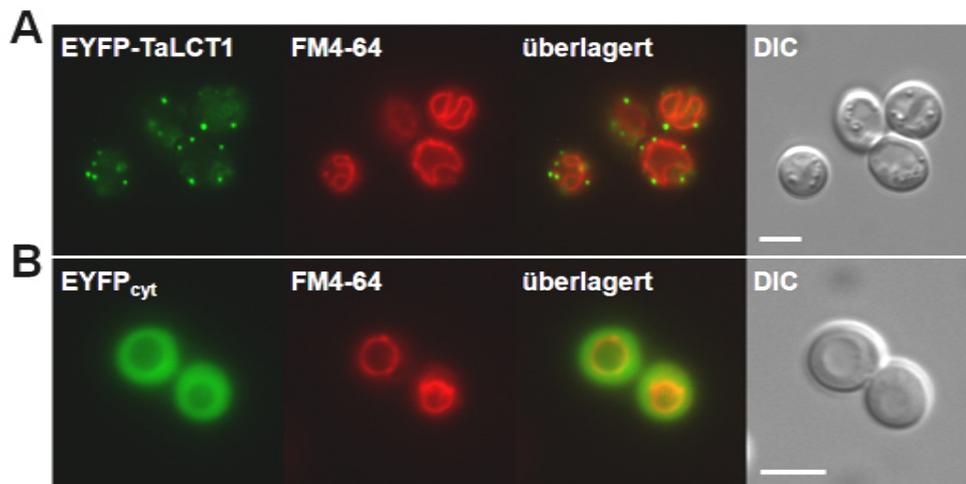
**Abbildung 3.36. Untersuchung der endocytotischen Aufnahme von FM4-64 in *TaLCT1*-exprimierende Hefezellen.**

(A) Die Inkubation von Hefezellen mit 5  $\mu\text{M}$  FM4-64 für 20 Minuten bei 0°C bewirkt eine deutliche Akkumulation des lipophilen Farbstoffs in der Plasmamembran. EYFP-TaLCT1-Signale sind dagegen nicht in der Plasmamembran detektierbar. (B) Die weitere Inkubation der Hefen für 10 Minuten bei Raumtemperatur bewirkt die Internalisierung des Farbstoffes. Vereinzelt kann eine Überlagerung von EYFP-TaLCT1-Signalen mit FM4-64-Fluoreszenz beobachtet werden (Pfeilspitzen). Maßstab für A und B = 5  $\mu\text{m}$ .

## Ergebnisse

Hierzu wurden Hefezellen zunächst auf Eis vorgekühlt und mit 5  $\mu\text{M}$  des Farbstoffs angefärbt (Kpt. 2.2.5.4). Diese Bedingungen bewirken eine Akkumulation in der Plasmamembran der Zellen. Eine Überlagerung der Fluoreszenz des Farbstoffs mit EYFP-TaLCT1-Signalen war hierbei nicht zu beobachten (Abb. 3.36.A). Die weitere Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur führte innerhalb weniger Sekunden zu einer vollständigen Aufnahme des Farbstoffs und zu einer Anreicherung in endozytotischen Vesikeln. Hierbei konnte vereinzelt auch eine Überlagerung von FM4-64 mit EYFP-TaLCT1-markierten Kompartimenten beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass, wie in Arabidopsis (Abb. 3.29.A), auch in Hefezellen frühe endozytotische Prozesse durch TaLCT1 nicht beeinflusst sind.

Nach etwa 30 bis 40 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte sowohl in *EYFP-TaLCT1*-transformierten Zellen wie auch in den *EYFP<sub>cyt</sub>*-Kontrollzellen eine verstärkte Akkumulation von FM4-64 in Vakuolenmembranen beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen somit gegen generelle *TaLCT1*-induzierte Störungen von Transportprozessen zur Vakuole in Hefen. Auffällig war allerdings, dass die Vakuolen der *EYFP-TaLCT1*-transformierten G19-Zellen häufiger eine stärkere Fragmentierung oder veränderte Morphologie zeigten, als die Vakuolen der *EYFP<sub>cyt</sub>*-Zellen (Abb. 3.37).



**Abbildung 3.37. Untersuchung des Transports von FM4-64 zur Vakuole in Hefezellen.**

Die Inkubation von Hefezellen für 30 bis 40 Minuten bei Raumtemperatur führt zur Anreicherung von FM4-64 in vakuolären Membranen. **(A)** Vakuolen *EYFP-TaLCT1*-exprimierender G19-Hefen zeigen, im Gegensatz zu **(B)** Hefen, die *cytosolisches EYFP* exprimieren, häufig eine abnorme Morphologie oder verstärkte Fragmentierung. Maßstab für A und B = 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.8.4. Messungen der cytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) in *TaLCT1*-transformierten Hefezellen

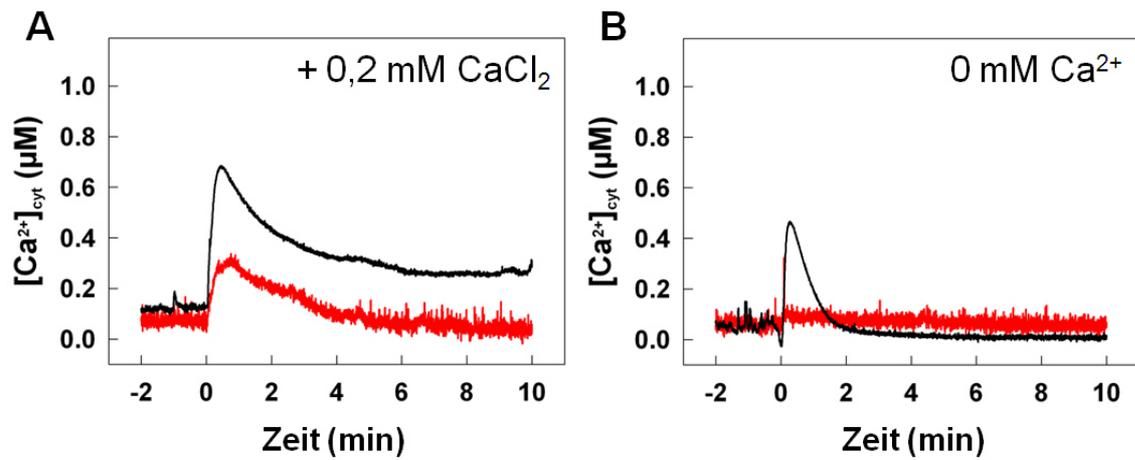
Bereits in früheren Studien mit Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von *TaLCT1* und  $Ca^{2+}$ -abhängigen Phänotypen, wie z.B. verringertes Wachstum in Anwesenheit erhöhter  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen oder der Komplementation einer  $\alpha$ -Faktor-sensitiven Hefemutante, beobachtet werden (Clemens *et al.*, 1998). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob *TaLCT1* möglicherweise einen Einfluss auf zelluläre  $Ca^{2+}$ -Signale hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Hefezellen mit dem Plasmid *pYES2-TaLCT1*, und dem Plasmid *pEVP11-AEQ* (Batiza *et al.*, 1996) transformiert. Letzteres trägt das Gen für das Protein APOAEQUORIN. Mithilfe dieses aus Quallen der Gattung *Aequorea* stammenden Proteins ist es möglich, Veränderungen cytosolischer  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in Echtzeit mittels Biolumineszenz zu messen (Shimomura *et al.*, 1962; Allen *et al.*, 1977).

Für die Messungen wurden hierbei Mutanten des Hefestamms CEN.SR36-3C (Euroscarf Acc. No. B0257A) verwendet, die eine Deletion des Gens *YVC1* tragen (*yvc1Δ*), das einen vakuolären Calciumkanal der TRP- (*transient receptor potential*) Familie kodiert. In der Literatur ist gezeigt, dass in Hefen das durch einen hyperosmotischen Schock ausgelöste cytosolische  $Ca^{2+}$ -Signal zum einen durch einen extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Einstrom und zum anderen durch eine Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Kompartimenten entsteht (Matsumoto *et al.*, 2002). Als Vermittler des extrazellulären Calciumeinstroms wurden hierbei die Gene *CCH1* und *MID1* beschrieben, deren Genprodukte den Plasmamembran-lokaliserten  $Ca^{2+}$ -Kanal CCH1/MID1 bilden (Paidhungat & Garrett, 1997; Iida *et al.*, 1994). Der intrazelluläre Teil des  $Ca^{2+}$ -Signals ist dagegen vakuolären Ursprungs und wird durch den TRP-Kanal *YVC1* freigesetzt (Palmer *et al.*, 2001). Ohne externes  $Ca^{2+}$  im Kulturmedium wird in *yvc1Δ*-Zellen daher kein NaCl-induziertes  $Ca^{2+}$ -Signal generiert (Denis & Cyert, 2002).

In luminometrischen Messungen zeigte sich in *TaLCT1*-exprimierenden Hefezellen infolge eines applizierten osmotischen Schocks (1 M NaCl-Endkonzentration) bei Anwesenheit von 0,2 mM  $Ca^{2+}$  im Medium ein stärkeres transientes  $Ca^{2+}$ -Signal als in Hefezellen, die mit dem leeren *pYES2*-Vektor transformiert waren (Abb. 3.38.A). Wurde externes  $Ca^{2+}$  mithilfe des Calciumchelators EGTA entfernt, war in den Kontrollzellen kein osmotisch induziertes  $Ca^{2+}$ -Signal detektierbar. Dieses Ergebnis entspricht somit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen (Denis & Cyert, 2002). Im Gegensatz dazu wurde in den *TaLCT1*-exprimierenden Zellen jedoch weiterhin ein transientes  $Ca^{2+}$ -Signal ausgelöst (Abb. 3.38.B). Dieses wurde weder durch Einstrom über die Plasmamembran, noch durch Freisetzung aus der Vakuole

## Ergebnisse

mittels YVC1 generiert, sondern möglicherweise aus dem Kompartiment freigesetzt, in dem TaLCT1 lokalisiert ist.

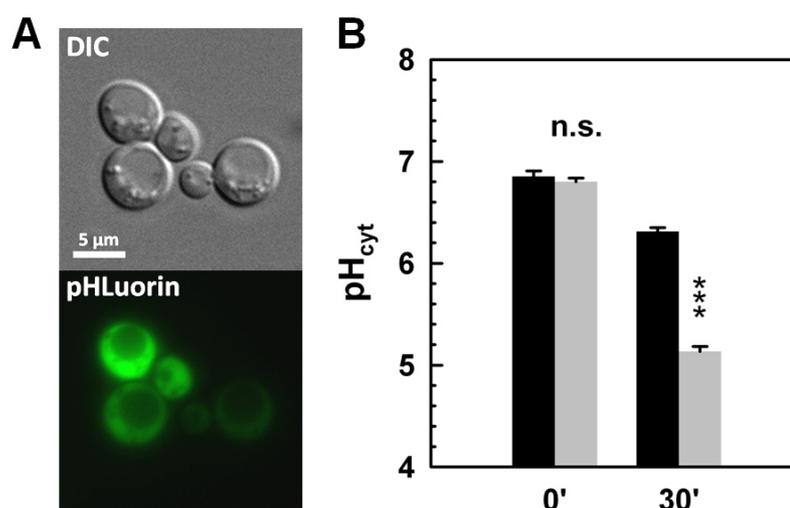


**Abbildung 3.38. Calciummessungen in transformierten Hefezellen.**

(A) Mit dem Gen des  $Ca^{2+}$  Reporterproteins APOAEQUORIN transformierte *yvc1Δ*-Hefezellen zeigen bei der Anwesenheit von 0,2 mM Calcium im Kulturmedium ein NaCl-induzierbares transientes  $Ca^{2+}$ -Signal. In *TaLCT1*-exprimierenden Zellen (schwarze Linien) war dieses Signal stärker als in den mit dem Leerplasmid *pYES2* transformierten Zellen (rote Linien). (B) Wurde freies externes  $Ca^{2+}$  mit Hilfe von EGTA aus dem Medium entfernt, so zeigten die mit dem leeren Plasmid transformierten *yvc1Δ*-Zellen kein NaCl-induziertes  $Ca^{2+}$ -Signal. In den *pYES2-TaLCT1*-transformierten Zellen war dagegen weiterhin ein transientes  $Ca^{2+}$ -Signal detektierbar.

## 3.8.5. Messungen des cytosolischen pH-Werts ( $\text{pH}_{\text{cyt}}$ ) in *TaLCT1*-transformierten Hefezellen

Da die Verlagerung von Ionen innerhalb der Zelle oftmals an Protonengradienten gekoppelt ist, stellte sich die Frage, ob *TaLCT1* möglicherweise einen Einfluss auf den cytosolischen pH-Wert der Zellen nimmt. Zur Klärung dieser Frage wurden *TaLCT1*-transformierte G19-Hefezellen zusätzlich mit dem Plasmid *pJR1138-pHLuorin* transformiert. Dieses Plasmid trägt ein Gen, welches für die pH-sensitive GFP-Variante pHLuorin kodiert (Miesenböck *et al.*, 1998; Orij *et al.*, 2009). Hefeklonen, die eine starke pHLuorin-Fluoreszenz zeigten, wurden für die weiteren Experimente ausgewählt (Abb. 3.39.A).



**Abbildung 3.39. pH-Messungen in transformierten Hefezellen.**

Zur Messung des intrazellulären pH-Werts wurden G19-Hefezellen mit dem Gen für das fluoreszierende, pH-sensitive Reporterprotein pHLuorin transformiert. (A) Die Abbildung zeigt exemplarisch fluoreszierende *pHLuorin*-exprimierende G19-Zellen. (B) Zellen die zusätzlich *TaLCT1* exprimieren (graue Balken), zeigen 30 Minuten nach Behandlung mit 1 M NaCl einen signifikant stärkeren Abfall des cytosolischen pH-Werts als Zellen, die mit dem leeren *pYES2*-Vektor transformiert waren (schwarze Balken). Vor der Zugabe von NaCl (Zeitpunkt: 0') war der cytosolische pH-Wert nicht signifikant unterschiedlich. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) eines repräsentativen Experiments (3 Wiederholungen) mit je 5 Einzelmessungen. Die statistische Auswertung des Versuchs erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test, F-Test sowie Student'schem *t*-Test (n.s.  $P > 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Die Ergebnisse ratiometrischer Fluoreszenzmessungen zeigten, dass sich unter normalen Bedingungen der cytosolische pH-Wert *TaLCT1*-exprimierender Hefezellen nicht signifikant von dem der Kontrollzellen (transformiert mit dem leeren *pYES2*-Vektor) unterscheidet (Abb. 3.39.B). In beiden Fällen lag dieser bei ca. 6,8 und somit im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte (Marešová *et al.*, 2010; Orij *et al.*, 2011). Die Zugabe von NaCl-Lösung (1 M Endkonzentration) führte nach 30 Minuten in den *TaLCT1*-exprimierenden Zellen zu einem drastischen Absinken des cytosolischen pH-Werts um ca. 1,6 Einheiten. In den Leervektor-transformierten Zellen wurde dagegen nur ein leichtes Absinken des pH-Werts beobachtet (Abb. 3.39.B). Diese Ergebnisse zeigen, dass *TaLCT1* in die  $\text{H}^+$ -Homöostase der Hefezelle interferiert.

### 3.9. Identifizierung und initiale funktionelle Charakterisierung eines Mitglieds der *LCT*-Genfamilie aus Gerste

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und initialen funktionellen Analyse möglicher weiterer Mitglieder der *Low-affinity Cation Transporter* Familie in Gerste. Obwohl zu *TaLCT1* homologe Gensequenzen in zahlreichen Süßgrasarten (z.B. Hirse, Reis, Zuckerrohr) gefunden wurden (Uraguchi *et al.*, 2014), war die Suche nach einem entsprechenden Vertreter in Gerste im Rahmen dieser Arbeit, z.B. mittels PCR mit degenerierten Oligonukleotiden, zunächst erfolglos. Im Jahr 2011 wurde allerdings aufgrund neu veröffentlichter Sequenzdaten (Matsumoto *et al.*, 2011) ein mögliches Homolog zu *TaLCT1* in Gerste identifiziert (NCBI Nukleotiddatenbank-ID: AK355284.1). Dieses zeigt vor allem auf Aminosäureebene Ähnlichkeit (~50%) zu *TaLCT1*. Auf Nukleotidebene besteht allerdings keine signifikante Ähnlichkeit zwischen beiden Genen (Abb. 3.40.A+B). Die BLAST-Suche in der *CerealsDB*-Weizen-Genomdatenbank (Tabelle 2.1.9) zeigte weiterhin, dass eine homologe Sequenz für dieses Gen auch im Weizen zu finden ist. Dies führte zu der Annahme, dass Weizen, neben dem bereits bekannten *TaLCT1*, ein weiteres putatives *Low-affinity Cation Transporter* Gen besitzt, welches infolgedessen *TaLCT2* genannt wurde. Das Homolog aus der Gerste wurde in Anlehnung daran *HvLCT2* genannt.

Die Ähnlichkeit in der Aminosäureabfolge von *TaLCT1* und *HvLCT2* spiegelt sich in den bioinformatisch vorhergesagten Hydrophobizitätseigenschaften wieder, was auf eine vergleichbare räumliche Struktur beider LCTs schließen lässt (Abb. 3.41). Der auffälligste Unterschied zwischen den Proteinen besteht in einem etwa 90 Aminosäuren-langen, hydrophilen N-Terminus bei *TaLCT1*, der bei *HvLCT2* nicht vorhanden ist (Abb. 3.40.B). Dieser N-Terminus wiederum wird aus vier Wiederholungen eines im Mittel 23 Aminosäuren-langen, Prolin-reichen Motivs gebildet, welches jeweils mit einem Methionin beginnt und mit den Aminosäuren Glycin, Serin und Leucin endet (Abb. 3.40.C).

# Ergebnisse

**A**

Blast 2 sequences

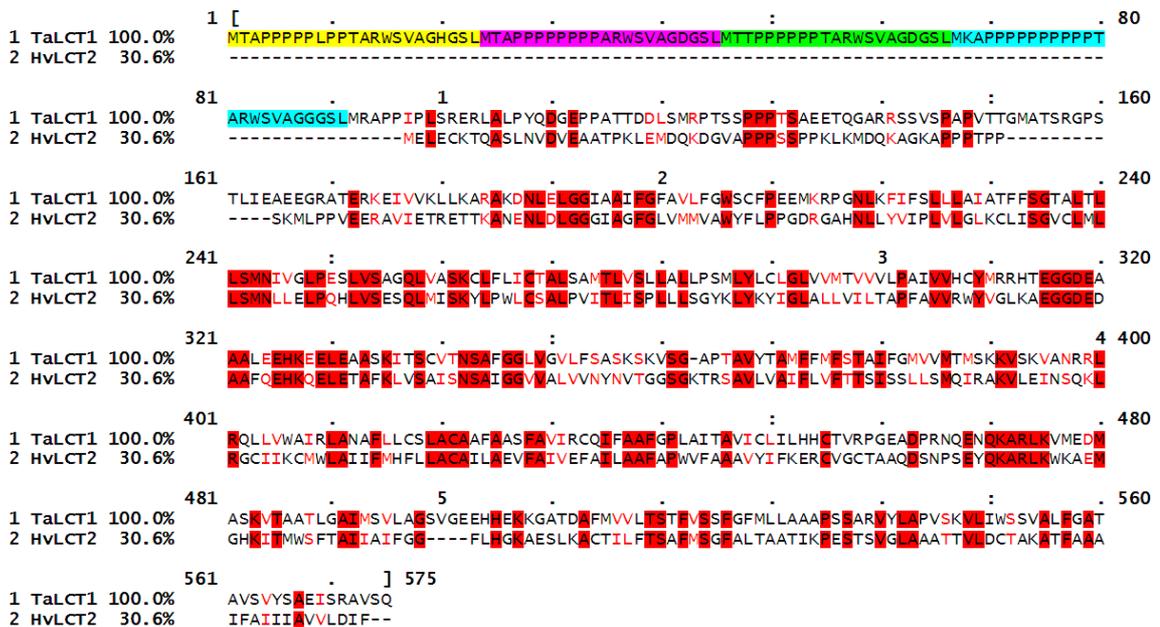
**TaLCT1**

RID	HH71366C11N (Expires on 04-22 17:23 pm)	Subject ID	Id Query_211951
Query ID	Id Query_211949	Description	HvLCT2
Description	TaLCT1	Molecule type	nucleic acid
Molecule type	nucleic acid	Subject Length	1383
Query Length	1725	Program	BLASTN 2.3.1+ <a href="#">▶ Citation</a>

**No significant similarity found. For reasons why, click here**

View reports: [▶ Search Criteria](#)

**B**



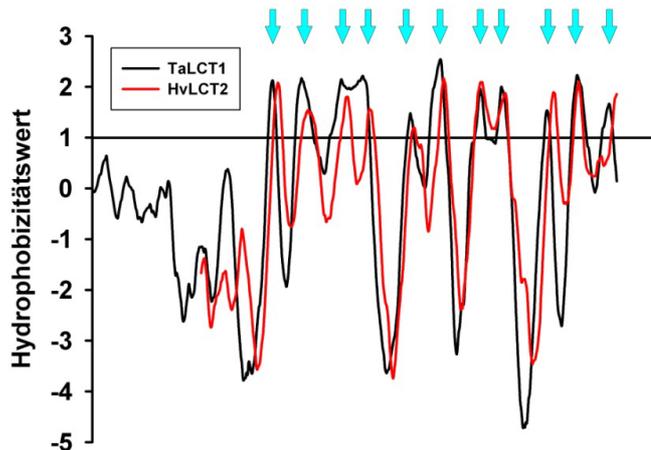
**C**

Motiv 1 : MTAPP--PPPLPPTARWSVAGHGSL  
 Motiv 2 : MTAPP--PPPP--ARWSVAGDGSL  
 Motiv 3 : MTT--PPPP--ARWSVAGDGSL  
 Motiv 4 : MKAPPPPPPPPTARWSVAGGGSL  
 .....  
 Konsensus : MTAPP--PPPPPTARWSVAGDGSL

**Abbildung 3.40. Alignment der Nukleotid- und Proteinsequenzen von TaLCT1 und HvLCT2.**

(A) Nukleotidsequenzen: Die offenen Leseraster (ORFs) von TaLCT1 und HvLCT2 zeigen keine signifikant ähnlichen Sequenzbereiche. Die Analyse erfolgte mit NCBI/BLASTN (Zhang *et al.*, 2000). (B) Proteinsequenzen: Rote Schattierung markiert identische Aminosäuren (~31%). Rote Schriftfarbe kennzeichnet funktionell oder strukturell ähnliche Aminosäuren (ergibt zusammen mit identischen Aminosäuren eine Ähnlichkeit beider Proteine von ca. 50%). Weiterhin sind vier repetitive Aminosäuremotive im N-Terminus von TaLCT1 mit unterschiedlichen farblichen Schattierungen unterlegt. Ein Alignment dieser Motive ist in (C) dargestellt. Rote Buchstaben kennzeichnen hier stark konservierte, blaue Buchstaben mittelstark konservierte und schwarze Buchstaben nicht konservierte Aminosäuren.

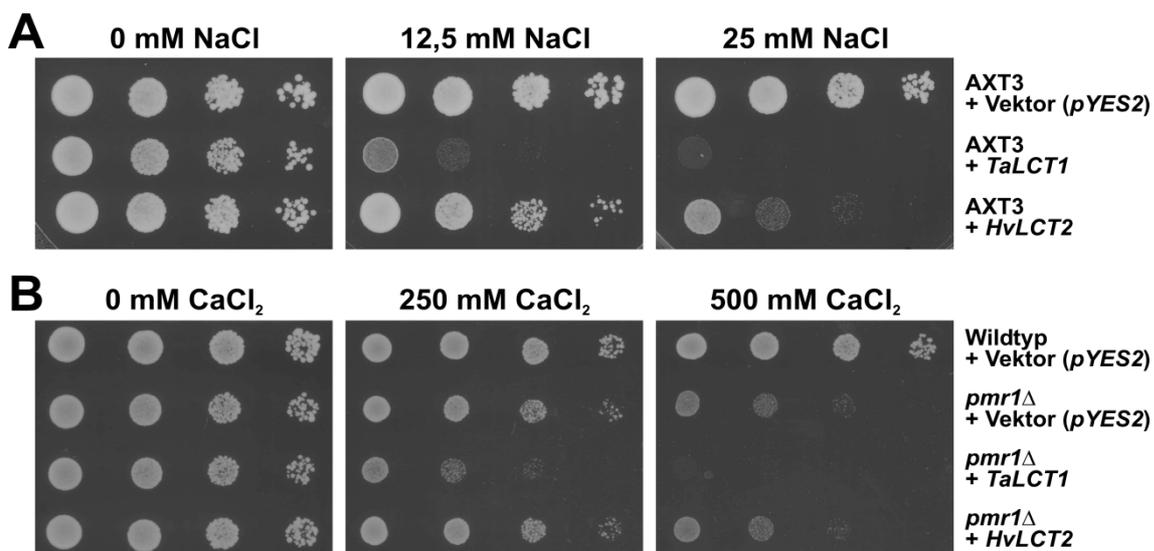
## Ergebnisse



**Abbildung 3.41. Bioinformatische Analysen zeigen für TaLCT1 und HvLCT2 ähnliche Hydrophobizitätstopologien.**

Die Hydrophobizitätsdiagramme wurden mithilfe des Programms *TopPred* (Version 1.10) unter Verwendung der Goldman-Engelman-Steitz Skala erstellt (von Heijne, 1992; Claros & von Heijne, 1994; Engelman *et al.*, 1986). Pfeile kennzeichnen stärker hydrophobe Bereiche, die putative Transmembrandomänen ausbilden (Cut off = 1,0).

Eine initiale funktionelle Analyse von *HvLCT2* zeigte, dass dieses, ähnlich wie *TaLCT1*, in der Lage ist, die Sensitivität von Hefezellen gegenüber erhöhten NaCl-Konzentrationen zu verstärken. Allerdings war die durch *HvLCT2* induzierte Hypersensitivität der AXT3-Mutante schwächer als die durch *TaLCT1* induzierte (Abb. 3.42.A). Des weiteren zeigte die heterologe Expression beider Gene, dass *HvLCT2*, im Gegensatz zu *TaLCT1*, die Sensitivität von Zellen der Ca<sup>2+</sup>-hypersensitiven Hefemutante *pmr1*Δ gegenüber erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen nicht verstärkt (Abb. 3.42.B).

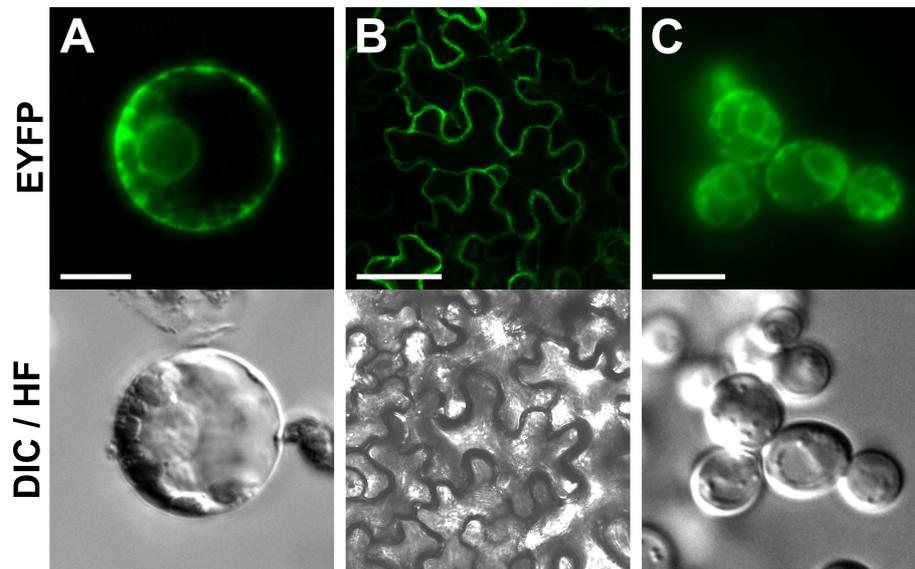


**Abbildung 3.42. Funktionelle Analyse von HvLCT2 in Hefezellen.**

(A) Sowohl *TaLCT1*- als auch *HvLCT2*-transformierte AXT3-Hefezellen (*ena1-4Δ nhx1Δ nha1Δ*; Quelle: Dr. Jose M. Pardo) zeigen Hypersensitivität gegenüber NaCl. (B) *HvLCT2* induziert, im Gegensatz zu *TaLCT1*, keine Hypersensitivität gegenüber CaCl<sub>2</sub> in Ca<sup>2+</sup>-sensitiven *pmr1*Δ-Hefezellen (Rudolph *et al.*, 1989).

## Ergebnisse

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation von HvLCT2 wurden N- und C-terminale *EYFP*-Fusionskonstrukte für die transiente Expression in Gerste-Protoplasten hergestellt. Die Ergebnisse der Analysen transformierter Protoplasten mittels Fluoreszenzmikroskopie deuten für beide Fusionskonstrukte auf eine Lokalisation in Kernmembranen und dem endoplasmatischen Retikulum (Abb. 3.43.A). Auch weitere Experimente mit entsprechenden *EYFP*-Konstrukten für die heterologe Expression von *HvLCT2* in Tabak- und Hefezellen zeigten eine subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine im ER und den Membranen der Zellkerne (Abb. 3.43.B und C).



**Abbildung 3.43. EYFP-fusioniertes HvLCT2 lokalisiert in Kernmembranen und endoplasmatischem Retikulum von (A) Gerste-Protoplasten, (B) Tabakepidermis- und (C) Hefezellen.**

Maßstab für A = 10  $\mu\text{m}$ , B = 50  $\mu\text{m}$ , C = 5  $\mu\text{m}$ .

### 4. Diskussion

Der Transport von Ionen über zelluläre Membranen spielt eine wichtige Rolle bei der Toleranz von Pflanzen gegenüber abiotischen Stressfaktoren. So hängt beispielsweise die Toleranz der Pflanze gegenüber Salzstress im Wesentlichen davon ab, wie gut es ihr gelingt, die Aufnahme toxischer Ionen (überwiegend Natriumionen) zu vermeiden, sie wieder auszuschließen oder sie in intrazelluläre Kompartimente, wie die Vakuolen, zu verlagern. Darüberhinaus bewirken Stressfaktoren im Allgemeinen spezifische Änderungen der Calciumkonzentration im Cytosol und/oder in Organellen der Zelle. Diese als Signale fungierenden Änderungen der Calciumkonzentration, die wiederum entscheidend für die Initiierung entsprechender Stressantworten sind, werden von Kanalproteinen, Transportern und Ionenpumpen ausgelöst und moduliert. Trotz intensiver Forschung ist die molekulare Identität der zugrunde liegenden Transportwege allerdings an vielen Stellen immer noch unklar. Als ein möglicher Transportweg sowohl für mono- als auch divalente Kationen wie  $\text{Na}^+$  oder  $\text{Ca}^{2+}$  ist die Süßgras-spezifische Familie der *Low-affinity Cation Transporter (LCTs)* beschrieben (siehe Kapitel 1.3).

Zum Zweck der funktionellen Analyse dieser Genfamilie, mit besonderem Fokus auf *TaLCT1*, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit heterologe und homologe Expressionsversuche in Hefen, Tabakzellen, Weizen-Protoplasten und *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen durchgeführt.

#### 4.1. Heterologe Expression von *TaLCT1* in Hefe

##### 4.1.1. Subzelluläre Lokalisation

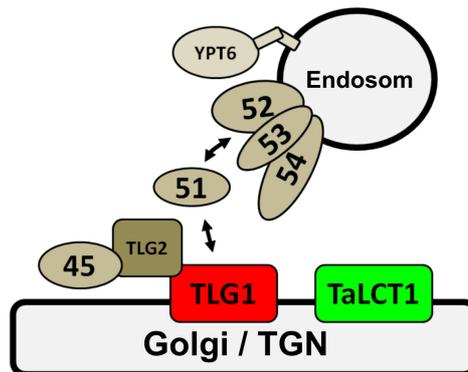
Aufgrund der früheren Ergebnisse aus Experimenten mit *TaLCT1*-transformierten Hefezellen wurde vermutet, dass *TaLCT1* sowohl in Hefen als auch möglicherweise in Pflanzenzellen in der Plasmamembran lokalisiert ist und dort direkt und vergleichsweise unspezifisch den Transport verschiedener Kationen bewerkstelligt (Schachtman *et al.*, 1997; Kapitel 1.3.1). Diese postulierte subzelluläre Lokalisation wurde bisher allerdings in keiner Studie bestätigt.

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation von *TaLCT1* wurden N- und C-terminale *EYFP*-Fusionskonstrukte erstellt. Hierbei zeigte sich, dass ein N-terminales Fusionskonstrukt in der Lage ist, eine vergleichbare Hypersensitivität gegenüber erhöhten Natrium-, Lithium- und Calciumkonzentrationen in Hefezellen zu induzieren wie unfusioniertes *TaLCT1* (Abb. 3.34). Die Analyse mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass das gebildete Fusionsprotein, entgegen den ursprünglichen Erwartungen, nicht in der Plasmamembran, sondern in punktförmigen, im Cytosol befindlichen Kompartimenten lokalisiert ist (Abb. 3.36.A). Weitere

## Diskussion

Koexpressionsversuche mit *mCherry*-fusionierten Markergenen zeigen eine partielle Kolokalisation mit dem *trans*-Golgi/TGN-Marker TLG1 (Holthuis *et al.*, 1998a). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch TaLCT1, zumindest teilweise, in diesem Golgi-Subkompartiment lokalisiert ist (Abb. 3.35.D).

Das SNARE-Protein TLG1 (*t*-SNARE affecting a Late Golgi Compartment 1) ist in Hefe Teil der molekularen Maschinerie, die retrograden Proteintransport und Membranfusion zwischen Endosomen, dem TGN und dem Golgi-Apparat vermittelt (Abb. 4.1; Conibear *et al.*, 2003). TLG1 bildet an Golgi/TGN-Membranen einen Komplex mit dem SNARE-Protein TLG2 und dem *Sec1/Munc18* Homolog VPS45 (Vacuolar Protein Sorting Factor 45) (Nichols *et al.*, 1998). Diese Bindung ermöglicht wiederum TLG1 über VPS51 die Interaktion mit dem so genannten GARP/VFT (Golgi-associated retrograde Protein/VPS Fifty-Three)-Komplex, der seinerseits aus den drei Faktoren VPS52, 53 und 54 aufgebaut ist (Conibear & Stevens, 2000; Siniosoglou & Pelham, 2002; Conibear *et al.*, 2003). Auf diese Art und Weise werden endosomale Vesikel und Golgi/TGN-Membranen für die weitere Fusion in räumliche Nähe gebracht. Reguliert wird dieser Prozess über YPT6 (Yeast Protein Transport #6), einem Mitglied der Familie der RAB (Rat sarcoma-related Proteins in Brain)-GTPasen (Siniosoglou & Pelham, 2001).



**Abbildung 4.1. EYFP-fusioniertes TaLCT1 zeigt partielle Kolokalisation mit ScTLG1-positiven Endomembrankompartimenten.**

Das Golgi/TGN-lokalisierte t-SNARE Protein TLG1 interagiert mit VPS45/TLG2 und dem GARP/VFT-Komplex und vermittelt so retrograden Membrantransport zwischen Endosomen, Trans-Golgi Netzwerk und Golgi-Apparat (modifiziertes Modell nach Conibear *et al.*, 2003).

### 4.1.2. Effekte von TaLCT1 in Hefen, die auf Störungen des Vesikel- und Membrantransports deuten

Sowohl die subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in ScTLG1-positiven Endomembran-kompartimenten von Hefen als auch die Ergebnisse aus Expressionsversuchen in Pflanzen und pflanzlichen Zellen (s.u.) lassen es möglich erscheinen, dass heterolog exprimiertes *TaLCT1* die Funktionalität dieser Kompartimente beeinflusst.

Ein häufiger Phänotyp, der als Folge gestörten Vesikel- und Membrantransports (V&MT) beschrieben wird, ist eine gesteigerte Sensitivität gegenüber kationischen Aminoglykosidantibiotika, wie Hygromycin B (HygB) oder G418/Geneticin (Fell *et al.*, 2011). Auch *TaLCT1*-transformierte G19-Zellen zeigten eine stärkere Verschlechterung des Wachstums auf Aminoglykosid-haltigen Kulturmedien (Anhang Abb. 8.2.A). Die erhöhte Sensitivität von Hefezellen gegenüber diesen Antibiotika kann häufig, aber nicht immer, als Folge einer Hyperpolarisation der Plasmamembran beobachtet werden, die wiederum durch eine Veränderung der Kationenhomöostase (z.B. verringerte K<sup>+</sup>-Aufnahme) hervorgerufen wird (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006). Interessanterweise führte die Expression von *TaLCT1* in Wildtyp-Zellen zu einem entgegengesetzten Phänotyp wie in G19-Zellen (Anhang Abb. 8.2.B). So zeigten *TaLCT1*-Wildtyp-Zellen, im Vergleich zu Leervektor-transformierten Kontrollzellen, ein verbessertes Wachstum auf HygB- und G418-Medien. Dies könnte möglicherweise auf unterschiedliche Effekte von TaLCT1 auf das Membranpotential in beiden Hefestämmen hindeuten. Allerdings konnten Marešová *et al.* (2012) zeigen, dass die erhöhte HygB-Sensitivität in *ypt6Δ*-Mutanten nicht mit einer Hyperpolarisierung der Plasmamembran einhergeht. Der gleiche Effekt kann auch in *nhx1Δ*-Zellen beobachtet werden (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006). Dies bedeutet, dass bei der Toleranz von Hefezellen gegenüber Aminoglykosiden neben der Aufnahme der toxischen Kationen auch deren intrazelluläre Sequestrierung möglicherweise eine wichtige Rolle spielt (Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2006). Solche Vorgänge wiederum könnten in V&MT-Mutanten gestört sein. Die genauen Ursachen für die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich *TaLCT1* in Wildtyp- und G19-Zellen sind unklar, könnten aber mit generell veränderten Ionengleichgewichten in den Hefestämmen zusammen hängen.

Weitere Experimente mit FM4-64 belegten, dass die frühe Endocytose des lipophilen Membranfarbstoffs sowie dessen Transport zur Vakuole in *TaLCT1*-exprimierenden G19-Hefezellen nicht verändert ist (Abb. 3.36). Nach Anreicherung des Farbstoffs in der Vakuolenmembran wird allerdings deutlich, dass die Vakuolen der *TaLCT1*-Zellen häufiger eine abnorme Morphologie und Fragmentierung aufweisen als Kontrollzellen (Abb. 3.37). Vergleichbare morphologische Veränderungen der Vakuolen sind auch bei Hefemutanten für direkte Komponenten des retrograden

Proteintransports wie *TLG1* oder *VPS51* beschrieben (Lewis & Pelham, 2002; Siniosoglou & Pelham, 2002). Auch Deletionen für *PMR1* oder *NHX1*, die als Regulatoren der luminalen  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. pH-Homöostase eine indirekte Rolle beim Membran- und Proteintransport spielen, ziehen eine verstärkte Fragmentierung der Vakuolen nach sich (Yadav *et al.*, 2007; Qiu & Fratti, 2010).

Weiterhin zeigen *TaLCT1*-exprimierende Hefen (Wildtyp und G19) ein schlechteres Wachstum bei erhöhten Inkubationstemperaturen (Anhang Abb. 8.3). Dieser Phänotyp, der auf gestörte Transportprozesse von oder zur Plasmamembran hindeuten kann (Novick & Schekman, 1979; Riezman, 1985), wurde ebenfalls für Mutanten von Komponenten des retrograden Proteintransports gezeigt (Li & Warner, 1996; Lewis & Pelham, 2002; Siniosoglou & Pelham, 2002; Shanks *et al.*, 2012). Auch die Deletion des Gens der Golgi-lokaliserten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase *PMR1* bewirkt einen Wachstumsdefekt bei hohen Inkubationstemperaturen (Park *et al.*, 2001). Dies deutet auch bei diesem Phänotyp auf die Notwendigkeit einer regulierten Calciumhomöostase im Endomembransystem (s.u.).

### 4.1.3. Mögliche Erklärungen für die veränderte Kationenhomöostase in *TaLCT1*-exprimierenden Hefezellen

Frühere Versuche, mithilfe elektrophysiologischer Methoden in Hefen oder *Xenopus laevis* Oozyten Ionenströme zu messen, die auf *TaLCT1* zurückgeführt werden können, waren ohne Erfolg (laut Amtmann *et al.*, 2001 unveröffentlichte Daten von D. Schachtman & S. Roberts). Aus diesen Gründen diskutierten kritische Stimmen, dass *TaLCT1* möglicherweise nicht selbst Kationen über die Plasmamembran transportiert, sondern dass die beobachteten Effekte indirekter Natur sein könnten. Die Veränderungen der Kationenhomöostase in Hefezellen wären beispielsweise auch durch eine Aktivierung endogener Transportsysteme durch das heterolog exprimierte *TaLCT1* erklärbar (Clemens *et al.*, 1998; Tester & Davenport, 2003; Plett & Moller, 2009).

Zahlreiche Einzel- und Hochdurchsatzuntersuchungen zeigen, dass Hefemutanten, die Gendelektionen für Komponenten des retrograden Proteintransports tragen, Defekte in der Homöostase verschiedener Kationen (z.B.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Cd}^{2+}$ ) aufweisen, die wiederum Parallelen zu den Phänotypen zeigen, die infolge der Expression von *TaLCT1* zu beobachten sind (zusammengefasst in Tabelle 4.1.1).

Wie bereits eingangs erwähnt, zeigten frühere Studien, dass die Expression von *TaLCT1* in einer *trk1,2ΔΔ*-Hefemutante zu einer erhöhten Aufnahme des  $\text{K}^+$ -Homologs  $^{86}\text{Rb}^+$  führt. Die ermittelten Aufnahmezeiten lagen hierbei im niedrig-affinen Bereich, was auch zur Namensgebung des Gens/Proteins führte.

## Diskussion

**Tabelle 4.1.1 Hefemutanten, die in Genen des retrograden Membrantransports zwischen Endosomen und Golgi-Apparat deletiert sind, weisen Defekte in der Kationenhomöostase und -resistenz auf, die den Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender Hefen ähneln.**

Abkürzungen und Farbkodierung: k.l. = keine Informationen; grün = Effekt ähnlich in *TaLCT1*-exprimierenden Hefen; gelb = Effekt anders in *TaLCT1*-exprimierenden Hefen. Die angegebenen Indices verweisen auf folgende Referenzen: 1 = Yu *et al.*, 2012; 2 = Rieger *et al.*, 1999; 3 = de Groot *et al.*, 2001; 4 = Fell *et al.*, 2011; 5 = Auesukaree *et al.*, 2009; 6 = Zhao *et al.*, 2013; 7 = Zhao *et al.*, 2010; 8 = Dudley *et al.*, 2005; 9 = Warringer *et al.*, 2003; 10 = Marešová *et al.*, 2012; 11 = Abeliovich *et al.*, 1998.

Phänotyp	Mutante	<i>tlg1Δ</i>	<i>tlg2Δ</i>	<i>vps45Δ</i>	<i>vps51Δ</i>	<i>vps52Δ</i>	<i>vps53Δ</i>	<i>vps54Δ</i>	<i>ypt6Δ</i>
Resistenz gegen CaCl <sub>2</sub>		k.l.	verringert <sup>1</sup>	verringert <sup>8</sup>	verringert <sup>6</sup>	verringert <sup>8</sup>	verringert <sup>3</sup>	verringert <sup>8</sup>	k.l.
Ca <sup>2+</sup> -Akkumulation		k.l.	erhöht <sup>2</sup>	unverändert <sup>1</sup>	unverändert <sup>6</sup>	erhöht <sup>6</sup>	erhöht <sup>1</sup>	unverändert <sup>1</sup>	k.l.
Resistenz gegen Na <sup>+</sup> oder Li <sup>+</sup>		k.l.	verringert <sup>11</sup>	verringert <sup>5</sup>	verringert <sup>7</sup>	verringert <sup>7</sup>	verringert <sup>7</sup>	verringert <sup>9</sup>	verringert <sup>10</sup>
Na <sup>+</sup> - oder Li <sup>+</sup> -Akkumulation		k.l.	verringert <sup>7</sup>	verringert <sup>1</sup>	unverändert <sup>7</sup>	erhöht <sup>7</sup>	erhöht <sup>7</sup>	unverändert <sup>1</sup>	k.l.
<sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> -Aufnahme		k.l.	erhöht <sup>4</sup>	k.l.	erhöht <sup>4</sup>	erhöht <sup>4</sup>	erhöht <sup>4</sup>	erhöht <sup>4</sup>	verringert <sup>4</sup>
Resistenz gegen CdCl <sub>2</sub>		k.l.	k.l.	verringert <sup>1</sup>	verringert <sup>8</sup>	verringert <sup>8</sup>	k.l.	verringert <sup>8</sup>	k.l.
Cd <sup>2+</sup> -Akkumulation		k.l.	unverändert <sup>1</sup>	erhöht <sup>1</sup>	erhöht <sup>1</sup>	unverändert <sup>1</sup>	unverändert <sup>1</sup>	unverändert <sup>1</sup>	k.l.
Zn <sup>2+</sup> -Akkumulation		k.l.	unverändert <sup>1</sup>	k.l.					

In einer breit angelegten Hochdurchsatzstudie von Fell *et al.*, 2011 wurden 156 Hefegene (von insgesamt 4653 getestet) identifiziert, deren Deletion zu Defekten in der zellulären K<sup>+</sup>-Homöostase und der Aufnahme von <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> führt. Interessanterweise bildeten unter diesen Genen bekannte Komponenten oder Regulatoren des V&MT die größte Gruppe. Des weiteren scheint der veränderte K<sup>+</sup>/Rb<sup>+</sup>-Transport in den meisten dieser V&MT-Mutanten keine Folge einer veränderten Lokalisation oder Abundanz des Plasmamembran-lokalisiereten TRK1-Proteins zu sein, welches den hoch-affinen Hauptaufnahmeweg für K<sup>+</sup> (und Rb<sup>+</sup>) in Hefezellen darstellt (Gaber *et al.*, 1988). Während die Deletion der Mehrheit der untersuchten Gene eine Verringerung der <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme zur Folge hatte, bewirkte das Ausschalten von Komponenten des retrograden Proteintransports z.T. eine starke Erhöhung der <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme. Die stärkste <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten nach 30 Minuten *vps51Δ*- (3,72-fach erhöht) und *tlg2Δ*-Mutanten (2,76-fach erhöht) (Fell *et al.*, 2011). Im Fall *TaLCT1*-exprimierender Zellen war zum gleichen Zeitpunkt die ermittelte <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme im Durchschnitt 3,5 mal höher als bei den Kontrollzellen (Schachtman *et al.*, 1997). Die Ergebnisse liegen somit in einem vergleichbaren Bereich wie die, die für *vps51Δ*- und *tlg2Δ*-Mutanten ermittelt wurden. Wie bereits erwähnt, konnten sowohl TLG2 als auch VPS51 mithilfe von *Yeast Two-Hybrid* Analysen als direkte Interaktionspartner von TLG1 identifiziert werden (Conibear *et al.*, 2003). Für *TLG1* selbst sind dagegen in der Studie von Fell *et al.* (2011) keine Defekte in der Kationenhomöostase beschrieben, da Mutanten für dieses Gen in der untersuchten Hefestammkollection nicht vorlagen (Quelle: Stanford Yeast Deletion Project, 2000 (2007 zuletzt aktualisiert)). *ypt6Δ*-Mutanten zeigten interessanterweise, im Gegensatz zu *tlg2Δ*- und *vps51Δ*-Mutanten, eine geringere <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>-Aufnahme als der Wildtyp (Fell *et al.*, 2011). Dieses und andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass einzelne Komponenten des retrograden Proteintransports höchstwahrscheinlich auch in

## Diskussion

---

anderen zellulären Prozessen involviert sind (Logg *et al.*, 2008). Für YPT6 sind beispielsweise neben der Regulation des retrograden Proteintransports auch Rollen bei Transportvorgängen im frühen sekretorischen Weg sowie der Biosynthese von Ribosomen beschrieben (Li & Warner, 1996).

Eine ursprüngliche Hypothese, dass Störungen des V&MTs Veränderungen der Lokalisation oder Abundanz bestimmter Kationentransportproteine, z.B. in der Plasmamembran, nach sich ziehen würden, konnte experimentell bisher nicht bestätigt werden. Beispielsweise zeigen *ypt6Δ*-Mutanten erhöhte Sensitivität gegenüber Na<sup>+</sup> und Li<sup>+</sup> (Marešová *et al.*, 2012). Es wurde spekuliert, dass diese Phänotypen möglicherweise durch eine veränderte Lokalisation oder Aktivität von Alkalimetallionentransportern wie NHA1 (Bañuelos *et al.*, 1998), NHX1 (Nass *et al.*, 1997), ENA1-4 (Haro *et al.*, 1991) oder KHA1 (Ramírez *et al.*, 1998; Marešová & Sychrová, 2005) erklärt werden könnten. Entsprechende Experimente zeigten allerdings, dass multiple Deletionsmutanten der erwähnten Transporter immer noch stärker sensitiv sind, wenn das Gen der RAB-GTPase YPT6 zusätzlich deletiert ist (Marešová *et al.*, 2012). Aus diesem kumulativen Effekt lässt sich schließen, dass die Natrium- und Lithiumhypersensitivität der *Vesicle-trafficking*-Mutanten unabhängig von diesen Transportsystemen ist. Weiterhin konnte mithilfe GFP-fusionierter Genkonstrukte auch direkt gezeigt werden, dass die *YPT6*-Deletion scheinbar keinen nennenswerten Einfluss auf die Lokalisation einzelner Transporter wie NHA1 oder KHA1 hat (Marešová *et al.*, 2012). Auch der korrekte Plasmamembrantransport der ENA Na<sup>+</sup>-ATPasen, die die Hauptkomponenten der Salztoleranz in Hefen darstellen, scheint unabhängig von der Funktion des GARP/VFT-Komplexes zu sein (Logg *et al.*, 2008). Die heterologe Expression von *TaLCT1* in der AXT3-Mutante zeigt, dass auch die *TaLCT1*-induzierte Natriumhypersensitivität unabhängig von den Natriumtransportsystemen ENA1-4, NHA1 und NHX1 ist (Abb. 3.42.A). Somit wird deutlich, dass die Störung des retrograden Proteintransports am Golgi/TGN (z.B. durch Gendeletionen) sowohl die Sensitivität von Hefen gegenüber bestimmten Kationen als auch deren Homöostase durch bisher nicht bekannte Mechanismen verändert (Abb. 4.1.B). Wie für <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> direkt gezeigt, kann eine erhöhte Kationenakkumulation der entsprechenden Mutanten möglicherweise generell durch einen erhöhten Influx verursacht sein (Fell *et al.*, 2011), der weitgehend unabhängig von den bisher beschriebenen primären Hauptkomponenten des Ionentransports zu sein scheint (Marešová *et al.*, 2012). Anhand dieser Beobachtungen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere, bisher nicht bekannte, Kationentransportsysteme in diesen Mutanten verstärkt aktiv sind.

Wie bereits erwähnt, repräsentieren die TRK-Proteine den hoch- und mittel-affinen Hauptaufnahmeweg für Kalium- und Rubidiumionen in Hefezellen (Gaber *et al.*, 1988; Ramos *et al.*, 1994). Neben diesem ist allerdings auch niedrig-affiner, einwärts gerichteter Transport von Kationen über die Plasmamembran in *trk1,2ΔΔ*-Mutanten beschrieben (Madrid *et al.*, 1998). Das/die für diesen niedrig-affinen Kationentransport

## Diskussion

---

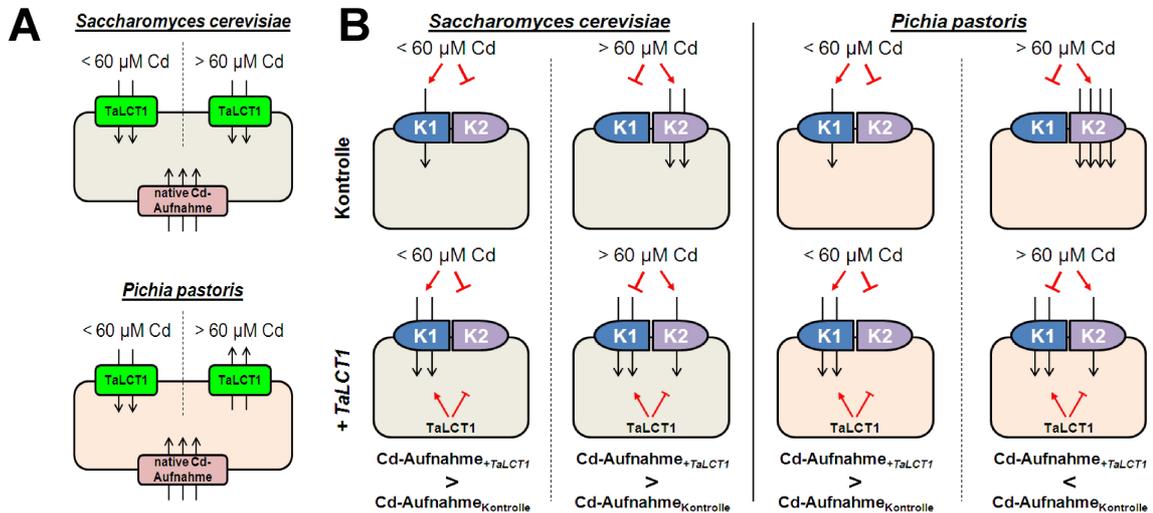
kodierende(n) Gen(e) sind allerdings bisher nicht identifiziert. Weitere elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass dieser, in folgenden Studien als NSC1 (für *Non-selective* (oder *Non-specific*) *cation* „channel“ 1) bezeichnete Transportweg, neben Kalium- und Rubidium-, auch für Lithium-, Natrium- und Cäsiumionen (und möglicherweise auch für divalente Kationen) permeabel ist (Bihler *et al.*, 1998; Ariño *et al.*, 2010). Desweiteren kann der NSC1-vermittelte Kationeneinstrom durch mittelhohe extrazelluläre Calcium- und Magnesiumkonzentrationen (~10 mM) oder durch einen verringerten pH-Wert des Kulturmediums signifikant blockiert werden (Bihler *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 1999; Bihler *et al.*, 2002; Ariño *et al.*, 2010). Die erhöhte, durch *TaLCT1* induzierte Aufnahme von  $^{86}\text{Rb}^+$  wird ebenfalls durch moderate  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen inhibiert (Schachtman *et al.*, 1997). Auch der Effekt der gesteigerten Natriumsensitivität infolge der *TaLCT1*-Expression wird durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zum Wachstumsmedium abgeschwächt (Amtmann *et al.*, 2001 & Anhang Abb. 8.4). Die Erniedrigung des pH-Werts des Kulturmediums auf 4,0 bewirkte ebenfalls eine Verringerung der Natriumsensitivität *TaLCT1*-exprimierender Zellen, wohingegen selbige durch eine Erhöhung des pH-Werts von 6,5 auf 7,5 deutlich verstärkt wird. Vergleichbare Effekte waren aber ebenfalls, in abgeschwächter Form, auch bei Leervektor-transformierten G19-Zellen zu beobachten (Anhang Abb. 8.4 & 8.5). Es erscheint daher möglich, dass *TaLCT1* direkt (z.B. durch Veränderungen von Calciumsignalen oder des cytosolischen pH-Werts) oder indirekt, durch Beeinflussung des V&MTs, das endogene, niedrig-affine Kationentransportsystem der Hefe, NSC1, stimuliert. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die  $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme in *TaLCT1*-transformierte Zellen durch Zugabe von Zuckern als Kohlenstoffquelle im Medium erhöht wird (Schachtman *et al.*, 1997). Ein stimulierender Effekt von fermentierbaren Zuckern ist auch für den endogenen, niedrig-affinen  $\text{K}^+/\text{Rb}^+$ -Influxweg der Hefe beschrieben (Ramos *et al.*, 1992; Alijo & Ramos, 1993; Madrid *et al.*, 1998). Somit war dieser Effekt, wie zu erwarten, auch in den Leervektor-transformierten *trk1,2ΔΔ*-Kontrollzellen zu beobachten. Zwar waren die absoluten  $\text{Rb}^+$ -Messwerte in den *TaLCT1*-Zellen jeweils höher als in den Kontrollen, relativ gesehen waren die Veränderungen der  $\text{Rb}^+$ -Aufnahme bei Zuckerzugabe zum Medium aber ähnlich (Schachtman *et al.*, 1997).

Clemens *et al.* (1998) und Diatloff *et al.* (2006) charakterisierten den Einfluss von *TaLCT1* auf die Homöostase divalenter Kationen in Wildtypen zweier Hefearten (*Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*) mit zum Teil unterschiedlichen oder gar widersprüchlichen Ergebnissen. So führte die Expression von *TaLCT1* zu unterschiedlichen Calcium-Aufnahmekinetiken in beiden Hefearten. Dieser Effekt könnte möglicherweise durch eine unterschiedlich starke Expression von *TaLCT1* erklärt werden.

Weiterhin führte die *TaLCT1*-Expression in *S. cerevisiae* aber auch zu einer Erhöhung der Aufnahme des Schwermetalls Cadmium bei Cadmiumkonzentrationen im Medium über und unter 60  $\mu\text{M}$  (Clemens *et al.*, 1998). Bei Cadmiumkonzentrationen

## Diskussion

unter 60  $\mu\text{M}$  zeigten auch *TaLCT1*-transformierte *P. pastoris* Zellen eine erhöhte Aufnahme. Dagegen bewirkte *TaLCT1* in diesen Zellen bei Konzentrationen über 60  $\mu\text{M}$  allerdings eine drastische Verringerung der Cadmiumaufnahme um 80% (Diatloff *et al.*, 2006).



**Abbildung 4.2. Modelle für die Erklärung der unterschiedlichen Aufnahme von Cadmium (Cd) durch *TaLCT1*-exprimierende *S. cerevisiae* und *P. pastoris* Zellen.**

(erstellt nach den Ergebnissen von Clemens *et al.*, 1998 und Diatloff *et al.*, 2006)

**(A)** Das bisherige Modell für den Kationentransport durch Plasmamembran-lokalisiertes *TaLCT1* würde in *P. pastoris* eine Umkehr der Ionentransportrichtung bei höheren Cd-Konzentrationen notwendig machen, um die, im Vergleich zu Kontrollzellen, verringerte Cd-Aufnahme erklären zu können. **(B)** Alternatives Modell einer *TaLCT1*-vermittelten Aktivierung/Hemmung eines nativen, aus zwei Komponenten (K1 + K2) bestehenden, Plasmamembran-lokalisierten Transportsystems für Cadmium. Transportkomponente K1 ist bei Cd-Konzentrationen im Medium von  $< 60 \mu\text{M}$  aktiviert, bei höheren Konzentrationen von  $> 60 \mu\text{M}$  inhibiert und kann dominant durch die *TaLCT1*-Aktivität stimuliert werden. Im Gegensatz dazu ist Komponente K2 bei geringeren Cd-Konzentrationen inhibiert, bei höheren aktiviert und wird durch *TaLCT1* in seiner Aktivität gehemmt. In diesem Modell ist in *P. pastoris* lediglich die Transportkomponente K2 bei höheren Cd-Konzentrationen stärker aktiv als in *S. cerevisiae*. Die Anzahl der schwarzen Pfeile soll die unterschiedliche Aktivität der Transportkomponenten symbolisieren.

Unter der Annahme des ursprünglichen Modells, dass *TaLCT1* Kationen direkt über die Plasmamembran transportiert, wäre dieses Ergebnis aus *P. pastoris* nicht durch eine unterschiedlich starke *TaLCT1*-Expression, sondern bestenfalls durch eine Umkehr der Ionentransportrichtung bei höheren Cadmiumkonzentrationen zu erklären (Abb. 4.2.A). Dieser Effekt sollte dann aber auch in *S. cerevisiae* zu erwarten sein.

Wie bereits von Diatloff *et al.* (2006) andiskutiert, könnten allerdings auch hier die unterschiedlichen Ergebnisse für beide Hefearten durch eine Aktivierung oder Hemmung nativer Transportsysteme durch *TaLCT1* erklärt werden. In dem in Abbildung 4.2.B vorgeschlagenen Modell wären die endogenen Transportkomponenten (K1 + K2) konserviert in beiden Hefearten vorhanden und auch die „Wirkung“ von *TaLCT1* wäre in beiden Hefen gleich. Unter diesen Voraussetzungen könnten die beobachteten Ergebnisse dann durch lediglich leicht veränderte

Transporteigenschaften der nativen Hefeproteine (im Modell: Transportkomponente K2) erklärt werden. Einige von Ariño *et al.* (2010) zusammengefasste Beispiele belegen, dass solche homologen Proteine aus verschiedenen Hefearten mit variierenden Transporteigenschaften, wie Affinität oder Kapazität, keine Seltenheit sind. Vielmehr stellen sie generell einen Faktor dar, durch den beispielsweise die unterschiedliche Salztoleranz verschiedener Hefearten oder auch nahe verwandter Hefestämme erklärt werden kann (Krauke & Sychrová, 2008).

### 4.1.4. Alternative Erklärungen für die Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender Hefen

Wie bereits diskutiert, konnte *TaLCT1*, in vesikulären Kompartimenten der Hefe lokalisiert werden, die teilweise mit dem SNARE-Protein *TLG1* im Golgi/TGN kolokalisieren. Diese Ergebnisse sprechen somit gegen die ursprüngliche Hypothese, dass *TaLCT1*, lokalisiert in der Plasmamembran, direkt Kationentransport in die Zelle vermittelt (Schachtman *et al.*, 1997). Obwohl die phänotypische Ähnlichkeit *TaLCT1*-exprimierender Hefen zu Mutanten für am retrograden Vesikeltransport beteiligter Proteine eine Interferenz von *TaLCT1* in diesen Prozess als Ursache der veränderten Kationenhomöostase nahelegt, sind alternative Mechanismen nicht auszuschließen. So könnte *TaLCT1* möglicherweise tatsächlich, räumlich lokal oder nur zeitweise, an der Plasmamembran lokalisiert sein.

Die transiente und unvollständige Vesikelfusion ist hauptsächlich für sekretorische Vesikel neuronaler Zellen beschrieben. Dieser auch als *Kiss-and-Run* Fusion (KR) bezeichnete Mechanismus steht im Gegensatz zur „klassischen“ *Full-collapse* Fusion (FF), bei der sekretorische Vesikel komplett mit der Zielmembran fusionieren und von dieser assimiliert werden (Alabi & Tsien, 2013). Darüberhinaus konnte in weiteren Studien an chromaffinen Zellen gezeigt werden, dass veränderte Calciumkonzentrationen den bevorzugten Fusionsmechanismus regulieren (Alés *et al.*, 1999). Würde ein solcher Mechanismus auch bei *TaLCT1*-tragenden Vesikeln zutreffen, könnte das Protein somit temporär an der Plasmamembran lokalisiert sein, ohne dass es mikroskopisch dort nachweisbar wäre.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass *TaLCT1* nicht homogen, sondern in Clustern an der Plasmamembran lokalisiert ist. Eine Möglichkeit für solche Cluster repräsentieren s.g. *lipid* oder *membrane rafts* (Lipid- oder Membranflöße). In Hefen bilden *lipid rafts* Ergosterol- und Sphingolipid-reiche Domänen, in denen bestimmte Membran-assoziierte Prozesse getrennt von anderen ablaufen können (Mollinedo, 2012). *Lipid rafts* werden in Hefen u.a. mit V&MT in Verbindung gebracht (Bagnat & Simons, 2002). Daneben scheinen aber beispielsweise auch Proteine wie die Plasmamembran-H<sup>+</sup>-ATPase *PMA1* oder der Kaliumtransporter *TRK1* verstärkt in *lipid*

*rafts* zu akkumulieren (Bagnat *et al.*, 2001; Yenush *et al.*, 2005). Auch bei der heterologen Expression des GFP-fusionierten Hexose-Protonen-Symporters *HUP1* aus *Chlorella kessleri*, ist eine Plasmamembran-Lokalisation in punktförmigen Strukturen zu beobachten, die als Ergosterol-reiche *lipid rafts* identifiziert werden konnten (Grossmann *et al.*, 2006). Weitere Studien deuten auch bei der Entstehung oder Verteilung von *lipid rafts* auf eine Beteiligung von Komponenten des GARP-Komplexes, wie VPS52 und VPS54 hin (Grossmann *et al.*, 2008).

EYFP-fusioniertes TaLCT1 konnte in Hefezellen partiell mit dem GARP-assoziierten SNARE-Protein TLG1 kolokalisiert werden. Darüberhinaus waren einige EYFP-Fluoreszenzsignale jedoch nicht mit dem Golgi/TGN-Marker überlagert. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Strukturen um TaLCT1, lokalisiert in *lipid rafts* in der Plasmamembran. Eine weitere Möglichkeit besteht aber auch hier darin, dass TaLCT1 durch eine veränderte Funktion des GARP-Komplexes die Bildung von *lipid rafts* beeinflusst. Dies könnte dann wiederum die Funktion *lipid raft*-lokalisierter, endogener Hefetransporter beeinflussen, was indirekt zu den beobachteten Veränderungen der Kationenhomöostase *TaLCT1*-exprimierender Hefen führen könnte. Ob TaLCT1 möglicherweise partiell in *lipid rafts* in der Plasmamembran lokalisiert ist oder aber deren Entstehung bzw. Verteilung beeinflusst, könnte in weiteren Kolokalisationsexperimenten mit entsprechenden Markerproteinen überprüft werden.

## 4.2. TaLCT1 in Pflanzen

### 4.2.1. Subzelluläre Lokalisation von TaLCT1 in Pflanzen

Zur weiteren Klärung der subzellulären Lokalisation von TaLCT1 wurden *EYFP*-Fusionskonstrukte für die stabile und transiente Expression in Pflanzen erstellt. Im Gegensatz zur Hefe zeigten in Arabidopsis sowohl die N- als auch die C-terminalen *EYFP*-Fusionen von TaLCT1 eine Lokalisation in punktförmigen, unterschiedlich stark fluoreszierenden Kompartimenten, die partiell mit intrazellulären FM4-64-Signalen überlagerten (Abb. 3.21). Diese Ergebnisse deuten somit auf eine Lokalisation der Fusionsproteine in Membranen endosomaler Kompartimente bzw. des *trans*-Golgi Netzwerks hin. Die schwächer fluoreszierenden, oft ringförmigen Strukturen (Abb. 3.22) dagegen erinnern in ihrer Morphologie an Golgi-Stapel (Robinson *et al.*, 2008; Naramoto *et al.*, 2014). Auch in transient exprimierenden Weizen-Protoplasten zeigte sich eine Lokalisation des *EYFP*-Fusionsproteins in vergleichbar punktförmigen Strukturen. Leider war diese Methode aufgrund der sehr niedrigen Transformationsrate für weitere Kolokalisationsexperimente ungeeignet.

In transient exprimierenden Tabakzellen überlagerten Fluoreszenzsignale von TaLCT1-EYFP erheblich mit Signalen des Golgi-Markers GmMan1-mCherry und

gelegentlich mit denen des TGN-Markers mCherry-AtSYP61 (Abb. 3.25). Diese Ergebnisse stützen somit die Beobachtungen aus Arabidopsis und Hefe.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Beobachtung, dass das TaLCT1-EYFP-Fusionsprotein in Tabak zu frühen Zeitpunkten der transienten Expression überwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Abb. 3.25), zu späteren Zeitpunkten aber verstärkt mit dem TGN-Marker AtSYP61 kolokalisiert (Abb. 3.27). Für diese Beobachtung sind zwei Erklärungen denkbar. Die erste wäre, dass der eigentliche Lokalisationszielort von TaLCT1 im TGN liegt, die Golgi-Lokalisation aber zu beobachten ist, weil das Protein nach seiner Synthese im ER auf dem Weg zum TGN durch die Zisternen des Golgi-Apparats transportiert wird. Dagegen spricht allerdings, dass zu späteren Zeitpunkten die Zahl der kleineren fluoreszierenden Golgi-Stapel deutlich geringer war und statt dessen nur noch wenige vergrößerte Aggregatstrukturen in den Zellen zu sehen waren. Bei fortlaufender Expression des TaLCT1-EYFP-Fusionsproteins wäre aber zu erwarten, dass sich die Zahl der fluoreszierenden Golgi-Stapel nicht verändert, da der Transport zum TGN über den Golgi-Apparat weiterhin stattfindet.

Eine alternative Erklärung für die Änderung der Lokalisation von TaLCT1 ist, dass das Protein zwar primär im Golgi-Apparat lokalisiert ist, wobei sich seine Lokalisation jedoch durch seine zunehmende Anreicherung in diesem Kompartiment verändert. Dies könnte beispielsweise dadurch verursacht werden, dass TaLCT1 durch seine Wirkung die Funktion anderer Proteine (z.B. SNAREs oder regulatorische GTPasen) beeinflusst, was Störungen des V&MTs zwischen Golgi und TGN nach sich ziehen könnte. Infolge dessen könnte sich dann auch die Lokalisation von TaLCT1 selbst vom Golgi-Apparat hin zum TGN verschieben. Die beobachteten Aggregatstrukturen könnten dabei eine Folge derart gestörter Transportprozesse sein.

Ein äquivalenter Effekt konnte für das GNOM-Protein (Mayer *et al.*, 1991), einem GTP-Austausch Faktor (GEF) für ARF-GTPasen, gezeigt werden. Im Gegensatz zu seinen Effektoren, den ARF1-GTPasen, welche hauptsächlich im TGN (und vereinzelt im Golgi) zu finden sind (Robinson *et al.*, 2011), lokalisiert GNOM überwiegend im Golgi-Apparat. Wird allerdings die Funktion von GNOM, und damit wiederum die Funktion von ARF1, durch Zugabe des Pilzgiftes Brefeldin A (BFA) inhibiert, verschiebt sich die Lokalisation von GNOM vom Golgi-Apparat zum TGN (Naramoto *et al.*, 2014). Eine längere Behandlung mit Brefeldin A führt schließlich zur Bildung intrazellulärer Aggregatstrukturen, die aus Elementen des Golgi-Apparats und des TGN bestehen, und die, in Anlehnung an den Namen des Inhibitors, auch „BFA-Kompartimente“ genannt werden (Robinson *et al.*, 2008). Die Bildung von BFA-Kompartiment-ähnlichen Aggregaten kann auch in einigen *gnom*- und *ARF1*-Mutanten direkt, ohne Zugabe von BFA, beobachtet werden (Naramoto *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2014). Da BFA die Funktion verschiedener GEFs allerdings relativ unspezifisch inhibiert (Teh & Moore, 2007; Nakano *et al.*, 2009), können Störungen im Transport nicht nur an *trans*-Golgi-

und *post*-Golgi-Membranen, sondern beispielsweise auch am ER und im *cis*-Golgi induziert werden (Ritzenthaler *et al.*, 2002; Nebenführ *et al.*, 2002).

### 4.2.2. Mögliche Ursachen für die Auxin-Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen

Die Inhibition der GNOM- und GNOM-ähnlichen Proteine durch BFA hat Wachstumsdefekte zur Folge, die den Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen in mehreren Punkten ähneln. So zeigen Pflanzen, die auf Nährmedien mit mittleren BFA-Konzentrationen (~10 µM) transferiert wurden, reduziertes Wurzellängenwachstum und gestörten Wurzelgravitropismus (Anhang Abb. 8.6.A; siehe auch Geldner *et al.*, 2001). Höhere BFA-Konzentrationen (~50 µM) verursachen morphologische Defekte in der frühen Entwicklung des Keimlings, die ebenfalls Ähnlichkeiten zu den *TaLCT1*-induzierten Keimlingsdefekten aufweisen (vgl. Anhang Abb. 8.7 mit Abb. 3.6 & 3.7). Noch höhere BFA-Konzentrationen (~100 µM) bewirken dagegen eine starke Verzögerung oder gar komplette Inhibition der Keimung (Nishimura *et al.*, 2012), vergleichbar mit dem Effekt, der infolge starker *TaLCT1*-Expression beobachtet werden kann (vgl. Anhang Abb. 8.7 mit Abb. 3.4.A). Die durch die BFA-Behandlung hervorgerufenen Wachstumsstörungen können z.T. durch Defekte in der Homöostase und des Transports des Phytohormons Auxin erklärt werden (Morris & Robinson, 1998). Die mithilfe des synthetischen Reportergenkonstrukts *DR5::GUS* sichtbar gemachten Veränderungen der Auxinverteilung in Wurzeln *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen ähneln den Beobachtungen, die für einige *GNOM*-Mutanten (z.B. *gnom<sup>RS</sup>* oder *gnom<sup>BE</sup>*) und für BFA-Behandlungen beschrieben sind (Geldner *et al.*, 2004; Moriwaki *et al.*, 2014). So zeigen beispielsweise *gnom<sup>RS</sup>*-Pflanzen, welche ein punktmutiertes *GNOM*-Allel mit reduzierter Proteinstabilität tragen, Veränderungen im basipetalen Auxintransport, der nach exogener Zugabe des synthetischen Auxins 1-NAA offenkundig wird (Geldner *et al.*, 2004). Ein vergleichbarer Effekt war auch bei *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen zu beobachten (Abb. 3.19). Weiterhin waren, ähnlich wie bei *TaLCT1*-Pflanzen (Abb. 3.18.C), bei Dexamethason-induzierbaren *RNAi*-Pflanzen mit verminderter *GNOM*-Expression ektope *DR5::GUS*- und *DR5::GFP*-Signale in Zellen der lateralen Wurzelhaube zu verzeichnen (Guo *et al.*, 2014). Sowohl das verminderte Wurzelwachstum als auch der gestörte Gravitropismus (Abb. 3.9 und 3.13) - Wachstumsdefekte, die z.T. auch bei den erwähnten *GNOM*-Mutanten zu beobachten sind (Geldner *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2014; Moriwaki *et al.*, 2014) - sind daher vermutlich eine Folge der veränderten Auxinverteilung in den Wurzeln *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen.

Diese Veränderungen im Auxintransport der *GNOM*-Mutanten (bzw. nach Behandlung mit BFA) beruhen sehr wahrscheinlich auf einer Störung der polaren

Lokalisation von Auxintransportern, wie z.B. PIN1 (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2001). Vergleichbare Effekte, wie ektope *DR5::GUS/GFP*-Signale, vermindertes Wurzelwachstum oder Agravitropismus, sind auch in *PIN1*-Überexpressoren (Mravec *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011) oder in *pid wag1/2 knockout*-Mutanten zu beobachten, in denen die PIN-Polarität aufgrund gestörter Proteinphosphorylierung verändert ist (Dhonukshe *et al.*, 2010; siehe auch Einleitung). Eine verminderte polare Lokalisation von GFP-fusioniertem PIN1 in den Plasmamembranen der Stelenzellen konnte z.T. auch in Wurzeln von älteren, auf Estradiol-haltiges Medium transferierten, *TaLCT1*-Pflanzen beobachtet werden (Abb. 3.31). Im Gegensatz dazu waren in *TaLCT1*-Keimlingen mit starken morphologischen Defekten, die direkt auf Estradiol-haltigem Medium keimten, intrazelluläre Aggregate und eine verminderte Plasmamembran-Lokalisation von PIN1-GFP zu beobachten (Abb. 3.32.B). Konsistent mit diesen Ergebnissen waren auch *DR5::GUS*-Signale sowie die Bildung von Statolithenstärke in den Wurzelspitzen bei vergleichbar defekten Keimlingen stark reduziert (Abb. 3.17).

Fluoreszierende PIN1-GFP-Aggregate waren trotz offensichtlicher Wurzelwachstumsdefekte in älteren *TaLCT1*-Pflanzen nicht zu beobachten. Dies könnte darauf hindeuten, dass *TaLCT1* in Arabidopsis, anders als BFA, nicht unspezifisch wirkt, sondern in unterschiedlichen Entwicklungsstadien unterschiedliche Prozesse beeinflusst. Auch die Tatsache, dass Veränderungen in der polaren Lokalisation von PIN2 weder in jungen Keimlingen noch in älteren Pflanzen beobachtet werden konnten, deutet darauf hin, dass *TaLCT1* spezifische Transportprozesse beeinflusst. Vergleichbare Effekte sind für die ROP3 (*Rat Sarcoma Homologues (Rho) of Plants #3*)-GTPase, die ebenfalls eine Rolle bei der polaren Lokalisation von PIN-Transportern spielt, beschrieben (Huang *et al.*, 2014). So ist in Pflanzen, die eine inaktive Form dieser GTPase konstitutiv überexprimieren (*DN-rop3*), während der frühen embryonalen Entwicklung PIN1 in intrazellulären Aggregaten mislokalisiert (Huang *et al.*, 2014). Die Folge des dadurch gestörten Auxinflusses sind Keimlinge mit z.T. stark verkümmerten Wurzeln (ähnlich wie bei *TaLCT1*-Keimlingen (Abb. 3.7)). Ältere *DN-rop3*-Pflanzen dagegen zeigen in Stelenzellen keine Aggregation, dafür aber eine Verschiebung der PIN1-Lokalisation von basal nach apikal, ähnlich wie in *PID/WAG1/2*-Mutanten (Dhonukshe *et al.*, 2010). Zusätzlich zu PIN1 ist in den *ROP3*-Mutanten auch die polare Lokalisation von PIN3 verändert. Ein möglicher Einfluss von *TaLCT1* auf andere (Auxin-) Transporter als PIN1 und PIN2 wurde nicht getestet und kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Gegenwärtig ist im Allgemeinen die Rolle von Kationentransportern bei der Regulation des polaren Auxintransports weitestgehend unbekannt. Unlängst wurde jedoch für den hoch-affinen Kaliumtransporter TRH1 (*T*iny *R*oot *H*airs *1*) aus der Familie der KUP/HAK/KT-Transporter eine Beteiligung an der Regulation des polaren Transports von PIN-Proteinen zur Plasmamembran postuliert (Rigas *et al.*, 2001; Rigas *et al.*, 2013; Dolan, 2013). Interessanterweise zeigt die Fusion mit fluoreszierenden Proteinen für TRH1 überwiegend eine subzelluläre Lokalisation in

Endomembranstrukturen. Ähnlich wie *TaLCT1*-Pflanzen, zeigen *trh1*-Arabidopsis-Nullmutanten u.a. agravitropes Wurzelwachstum, Störungen des polaren Auxintransports und mislokalisierte PIN-Transporter (Rigas *et al.*, 2013). Ob *TaLCT1* bei Expression in Arabidopsis möglicherweise in dieses Netzwerk eingreift, ist jedoch unklar. Auch die Frage, inwieweit die zugrunde liegenden Mechanismen auf monokotyle Pflanzen übertragbar sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.3. Parallelen zwischen *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen und Hefen

Da *AtSYP61* (*A. thaliana* - *Syntaxin of Plants 61*) ein pflanzliches Homolog des SNARE-Proteins *ScTLG1* ist (Sanderfoot *et al.*, 2001a), liegt die Vermutung nahe, dass *TaLCT1* in Hefen und Pflanzen in funktionell analogen Golgi/TGN-Kompartimenten lokalisiert. Daraus ergibt sich die Frage, ob die beobachteten Phänotypen in Pflanzen, ähnlich wie in der Hefe, mit einer Störung des GARP/VFT-Komplexes und seiner assoziierten Faktoren (Abb. 4.1) in Verbindung gebracht werden könnten.

In Arabidopsis besteht die Gruppe 4 der Syntaxine aus drei Homologen (*SYP41-43*) des SNARE-Proteins *ScTLG2* der Hefe, die in unterschiedlichen Subdomänen des TGN lokalisiert sind (Sanderfoot *et al.*, 2001a; Uemura *et al.*, 2012a). Für *SYP41* und *SYP42* konnte die Kolokalisation und direkte Interaktion mit *SYP61*, ähnlich wie in Hefe für *TLG2* und *TLG1*, gezeigt werden (Sanderfoot *et al.*, 2001a; Conibear *et al.*, 2003; Uemura *et al.*, 2004). Auch das dritte *TLG2*-Homolog, *SYP43*, kolokalisiert sowohl mit *SYP61* als auch mit *SYP41* und *42* (Uemura *et al.*, 2004). Bei den Beschreibungen der Phänotypen von Nullmutanten gehen die Ergebnisse auseinander. Während frühere Berichte angaben, dass die Inaktivierung von entweder *SYP41* oder *SYP42* männlich-gametophytisch letal ist (Sanderfoot *et al.*, 2001b), zeigen spätere Ergebnisse, dass Einzelmutanten der individuellen *SYP4*-Gene bestenfalls leichte morphologische Unterschiede zum Wildtyp aufweisen (Uemura *et al.*, 2012a). Ähnlich wie *TaLCT1*-exprimierende Arabidopsis-Pflanzen zeigen homozygote Doppel- und heterozygote Dreifachmutanten der *syp4*-Gene dagegen starke Phänotypen wie z.B. inhibiertes Wurzelwachstum oder gestörten Gravitropismus. Homozygote Dreifachmutanten sind letal. Darüberhinaus zeigen *syp42/syp43*-Doppelmutanten eine abnorme Golgi/TGN-Morphologie und intrazelluläre Akkumulation sekretorischer Proteine. Die Ergebnisse weiterer Analysen *DR5::GFP*-exprimierender Pflanzen deuten darauf, dass die beobachteten Wachstumsdefekte der *syp4*-Mutanten auf eine veränderte Auxinverteilung in den Wurzeln zurückzuführen sind (Uemura *et al.*, 2012a).

Für den vakuolären Proteinsortierungsfaktor *AtVPS45* aus Arabidopsis konnte eine Interaktion und Kolokalisation mit den Syntaxinen *SYP41* und *SYP61* an Membranen des TGN nachgewiesen werden (Bassham & Raikhel, 1998; Bassham *et al.*, 2000; Zouhar *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse scheinen vergleichbar mit den Interaktionen, die

für VPS45, TLG2 und TLG1 aus Hefe beschrieben sind (Nichols *et al.*, 1998). RNAi-Pflanzen sind mit abnehmender *VPS45*-Expression zunehmend im Wachstum gehemmt und zeigen Defekte im Transport von Proteinen zur Vakuole (Zouhar *et al.*, 2009). Die homozygote Nullmutation des Gens in Arabidopsis ist letal. Eine Punktmutation im Gen *VPS45* in *ben2*-Mutanten (*BFA-visualized Endocytic Trafficking Defective #2*) verhindert die Interaktion von VPS45 mit SYP4-Proteinen und führt darüberhinaus zu einer Verschiebung der subzellulären Lokalisation des Proteins vom TGN in ein unbekanntes Endomembrankompartiment. Weiterhin zeigen *ben2*-Mutanten, insbesondere in Kombination mit *ben1*, einer mutierten Version des ARF-GEFs AtMIN7, stark inhibiertes Wurzelwachstum, veränderte DR5::GFP-Signale in Wurzelspitzen und eine gestörte polare Lokalisation von PIN-Auxintransportern (Tanaka *et al.*, 2013).

Für das *UNHINGED*-Gen, welches für das VPS51-Homolog aus Arabidopsis kodiert, wurde eine Rolle bei der Auxin-regulierten Entwicklung der Blattmorphologie und -vaskulatur beschrieben (Pahari *et al.*, 2014). *vps51*-Nullmutanten (*unh-1*) zeigen darüberhinaus aber auch reduziertes Wurzelwachstum und veränderte DR5::GUS-Signale in Wurzelspitzen (Pahari, 2012 (Dissertation)). Die Phänotypen in *unh-1*-Pflanzen werden mit gestörtem PIN1-Transport und veränderten *PIN1*-Expressionsmustern in Verbindung gebracht. Der PIN2-Transport scheint nicht verändert. Weitere Experimente mit FM4-64 zeigen, dass die frühe Endocytose in *unh-1* nicht beeinflusst ist. Dagegen ist in Zellen der Mutanten eine verstärkte Akkumulation von FM4-64-markierten Aggregatstrukturen zu beobachten, was auf Defekte im Membrantransport hin zur Vakuole deutet (Pahari *et al.*, 2014). Eine vergleichbare Akkumulation von FM4-64-Aggregaten war auch in *TaLCT1*-exprimierenden Pflanzen zu beobachten (Abb. 3.29).

Wie bereits erwähnt, ist in Hefe VPS51 als Bindeglied zwischen dem GARP/VFT-Komplex, bestehend aus VPS52 bis 54, und dem SNARE-Protein TLG1 beschrieben (Conibear *et al.*, 2003). *Yeast-Two-Hybrid* Analysen zeigten dagegen, dass in Arabidopsis AtVPS51 scheinbar lediglich mit AtVPS52, nicht aber mit AtVPS53 und 54, interagiert. Diese Beobachtungen zeigen somit, dass trotz gewisser Gemeinsamkeiten die Interaktionen im GARP/VFT-Komplex in Hefen und Pflanzen nicht komplett identisch sind. Unklar ist auch, ob AtVPS51, wie in der Hefe, direkt mit dem TLG1-Homolog SYP61 interagiert. Eine partielle Kollokalisierung beider Proteine im TGN konnte allerdings gezeigt werden (Pahari, 2012 (Dissertation); Pahari *et al.*, 2014). Die unterschiedlichen Phänotypen von *AtVPS52*- (*POK*) und *AtVPS53*- (*HIT1*) Nullmutanten, auch mit Blick auf die bisher beschriebenen Faktoren, deuten darüberhinaus darauf hin, dass die einzelnen Komponenten nicht nur an GARP/VFT-assoziiertem V&MT sondern auch an anderen physiologischen Prozessen beteiligt sind. So ist für *hit1* (*Heat-intolerant 1*) -Mutanten verstärkte Sensitivität gegenüber Hitzestress (Wang *et al.*, 2011) und für *pok* (*Poky Pollen Tube*) -Mutanten reduziertes Pollenschlauchwachstum beschrieben (Lobstein *et al.*, 2004).

Für Nullmutanten von *TNO1* (*TGN-localized SYP41-interacting Protein*), welches für einen Interaktionspartner von SYP41 kodiert (Kim & Bassham, 2011), sind ebenfalls Phänotypen (z.B. veränderte *DR5::GFP*-Signale und verzögerter Gravitropismus) gezeigt, die mit einem gestörten Transport von Auxin in Verbindung gebracht werden (Roy & Bassham, 2015). Diese Phänotypen werden auch hier mit einer möglicherweise veränderten polaren Lokalisation von Auxintransportproteinen erklärt. Im Gegensatz zu *TNO1*, welches, wie der Name vermuten lässt, im TGN lokalisiert und operiert, scheint *USO1* (*yusou #1* - basierend auf dem japanischen Wort für „Transport“; Nakajima *et al.*, 1991), das entsprechende Homolog in Hefe, eher an Transportprozessen im frühen sekretorischen Weg, zwischen ER und Golgi, beteiligt zu sein (Noda *et al.*, 2007). Eine Interaktion von *USO1* mit Komponenten des retrograden Proteintransports am späten Golgi-Apparat ist dagegen nicht beschrieben.

Neben den Auxin-assoziierten Phänotypen zeigen *tno1*-Mutanten auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Salz- und osmotischem Stress. Diese Sensitivität wird mit der, ebenfalls in den *tno1*-Pflanzen beobachtbaren, Mislokalisierung von SYP61 in Verbindung gebracht (Kim & Bassham, 2011), denn auch *osm1* (*Osmotic Stress-sensitive Mutant #1*), eine *syp61*-Nullmutante, zeigt eine ähnlich erhöhte Sensitivität gegenüber Salz- und osmotischem Stress (Zhu *et al.*, 2002). Auch *syp42/syp43*-Mutanten sind hypersensitiv gegenüber Natriumchlorid und leicht sensitiv gegenüber equiosmolalen Sorbitolkonzentrationen, was ebenfalls auf eine Rolle dieser Gene bei der Reaktion auf Salz- und osmotischen Stress schließen lässt (Uemura *et al.*, 2012b; Baral *et al.*, 2015). Eine mögliche Erklärung für diese Phänotypen ist eine funktionelle Inhibierung der Golgi/TGN-lokalisierten Natriumtransporter NHX5 und NHX6, für die auch eine Kolo-kalisation mit SYP61 gezeigt werden konnte (Bassil *et al.*, 2011). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass *nhx5/nhx6*-Doppelmutanten, genau wie *syp42/syp43*-Doppelmutanten, einen generellen Wachstumsdefekt zeigen (Uemura *et al.*, 2012b). Somit könnte möglicherweise auch die NaCl-Hypersensitivität (Abb. 3.12) sowie das generell gehemmte Wachstum *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen mit einer Inhibierung dieser NHX-Transporter im Golgi/TGN im Zusammenhang stehen.

Zusammengefasst deuten viele Punkte darauf hin, dass, ähnlich wie in Hefen, die Phänotypen *TaLCT1*-exprimierender Arabidopsis-Pflanzen mit Störungen im Vesikel- und Membrantransport erklärt werden können.

## 4.4. Mögliche Wirkmechanismen von *TaLCT1*

### 4.4.1. Veränderungen intrazellulärer pH-Werte durch *TaLCT1*

Messungen des cytosolischen pH-Werts in transformierten Hefezellen mithilfe des genetisch kodierten pH-Sensors *pHLuorin* zeigten, dass *TaLCT1*-exprimierende Zellen nach Zugabe von Natriumchlorid eine starke Absenkung des cytosolischen pH-Werts

erfahren (Abb. 3.39). Aufgrund seiner subzellulären Lokalisation erscheint es möglich, dass TaLCT1 den Transport von Protonen, möglicherweise direkt gekoppelt mit Natriumionen, aus dem Lumen des späten Golgi-Apparats und des TGN ins Cytosol vermittelt. Dies wiederum hätte eine Ansäuerung des Cytosols und eine Erhöhung des pH-Werts im Golgi/TGN-Lumen zur Folge.

Der pH-Wert ist ein wichtiger Faktor, der großen Einfluss auf die Eigenschaften biologischer (Makro-) Moleküle und damit den Ablauf biochemischer Reaktionen hat. Aus diesem Grund funktionieren die meisten Proteine in einem relativ engen pH-Optimum. Extrem saure oder alkalische pH-Werte führen zur Denaturierung und funktionellen Inaktivierung der Proteine, aber auch bereits leichte pH-Schwankungen können den Protonierungsgrad geladener Aminosäurereste verändern (Garcia-Moreno, 2009). Die resultierende Änderung der Ladungsverteilung beeinflusst schließlich die Ausrichtung und die Stärke intra- und intermolekularer elektrostatischer Wechselwirkungen, wie Ionenbindungen oder H-Brücken. Damit wiederum ändert sich insgesamt die räumliche Proteinstruktur sowie die Löslichkeit und Interaktion von Proteinen mit Kofaktoren, Substraten oder anderen Proteinen (Dumetz *et al.*, 2008). Somit kann, wie auch von Schönichen *et al.* (2013) vorgeschlagen, der pH-Wert als häufig wenig beachteter regulatorischer Faktor wirken. Bereits minimale pH-Änderungen innerhalb der physiologischen Grenzen können bei Proteinen den Protonierungsgrad einzelner, als pH-Sensoren fungierender, Aminosäuren verändern. Über solche schnellen und auch reversiblen post-translationalen Modifikationen lassen sich dann wiederum die Eigenschaften (z.B. Affinität oder Stabilität) von Proteinen und Enzymen modulieren (Schönichen *et al.*, 2013). Die Gewährleistung der korrekten Funktion von Proteinen erfordert daher eine exakte Regulation des pH-Werts im Cytosol und in zellulären Kompartimenten (Garcia-Moreno, 2009).

Die Wichtigkeit des pH-Werts im Endomembransystem für den Transport von Proteinen und Membranen, sowohl in tierischen Zellen und Hefen, als auch Pflanzen, ist bekannt (Paroutis *et al.*, 2004; Qiu, 2012; Schumacher, 2014). Messungen in Arabidopsis und Tabak mithilfe organellärer pH-Sensoren deuten, ähnlich wie in tierischen Zellen (Paroutis *et al.*, 2004), auf eine sukzessive Ansäuerung vom Lumen des ER (pH 7,1 - 7,5), über den Golgi-Apparat (pH 6,8 - 6,9) und dem TGN/EE (pH 5,5 - 6,3), bis zur Vakuole (pH 5,2 - 6,0) (Shen *et al.*, 2013; Martiniere *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2015). Zum Aufbau des pH-Gradienten übernehmen V-ATPase-Komplexe (VHA; *Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase*) mit der regulatorischen Untereinheit *a1* den aktiven, ATP-getriebenen Transport von Protonen aus dem Cytosol in das Lumen des TGN/EE (Dettmer *et al.*, 2006). Die Aufnahme für den Ladungsausgleich notwendiger Anionen wird beispielsweise von Chloridtransportern der CLC-Familie (*chloride channels*) übernommen (Marmagne *et al.*, 2007; von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2007). Kationentransporter (z.B. CHX- oder NHX-Transporter) gewährleisten dagegen durch eine Alkalinisierung die „Feinregulation“ der luminalen pH-Werte im Endomembransystem (Schumacher, 2014; Reguera *et al.*, 2015).

## Diskussion

---

Wie bereits erwähnt, zeigen *syp42/syp43*-Mutanten ähnliche Wachstumsphänotypen wie *nhx5/nhx6*-Mutanten (und auch wie *TaLCT1*-exprimierende Arabidopsis-Pflanzen). Die Schlussfolgerung von Uemura *et al.* (2012b) daraus ist, dass die SYP4-Proteine möglicherweise für die Aufrechterhaltung der Lokalisation und damit der Funktion dieser Natriumtransporter wichtig sind, wodurch auch die erhöhte Salzsensitivität der Mutanten erklärt werden könnte. Denkbar ist allerdings auch der umgekehrte Fall, dass nämlich die Funktion der Golgi/TGN-lokalisierten NHX-Transporter wichtig für die Proteine ist, die den V&MT regulieren. Für diese Hypothese spricht beispielsweise, dass in *nhx5/nhx6*-Mutanten der Transport von FM4-64 zum Tonoplasten verzögert ist (Bassil *et al.*, 2011). Ein vergleichbar verzögerter FM4-64-Transport zur Vakuole ist auch in *det3* (*deetiolated 3*)-Mutanten zu beobachten (Luo *et al.*, 2015). Diese Pflanzen tragen eine schwache Mutation im *DET3*-Gen, welches für die Untereinheit C der V-ATPase kodiert. Während der pH-Wert der Vakuolen nicht verändert ist, zeigen intraluminale Messungen einen im Vergleich zum Wildtyp ( $\text{pH}_{\text{TGN}} 5,66$ ) signifikant alkalischeren pH-Wert in TGN/EE-Vesikeln von *det3*-Mutanten ( $\text{pH}_{\text{TGN}} 6,13$ ) (Luo *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu zeigten vergleichbare Messungen im Golgi und TGN von *nhx5/nhx6*-Mutanten einen im Vergleich zum Wildtyp signifikant saureren pH-Wert (Reguera *et al.*, 2015). Zusammengenommen belegen beide Ergebnisse somit, dass sowohl die Erhöhung als auch die Erniedrigung des normalen pH-Werts im Golgi/TGN-Lumen vergleichbare Störungen im Membran- und Proteintransport nach sich ziehen. Wie der pH-Wert direkten Einfluss auf derartige Transportvorgänge nehmen kann, ist für epitheliale Nephronzellen beschrieben. An diesen wurde gezeigt, dass die Rekrutierung cytosolischer ARF-GTPasen und ARF-GEFs an endosomale Membranen abhängig von der korrekten Funktion der V-ATPase und dem intraluminalen pH-Wert der Endosomen ist (Maranda *et al.*, 2001).

Störungen von Transportvorgängen können auch durch pH-ändernde Substanzen induziert werden. Die Behandlung mit Concanamycin A (ConcA) beispielsweise, einem Inhibitor, der die Untereinheit C der V-ATPase blockiert (Huss *et al.*, 2002), verursacht in Arabidopsis eine noch stärkere Alkalinisierung des TGN-Lumens als die, die in *det3*-Mutanten zu beobachten ist (Luo *et al.*, 2015). Weiterhin führt die pharmakologische Behandlung zum Anschwellen und Aggregieren von Golgi-Zisternen und TGN-Vesikeln (Robinson *et al.*, 2004; Dettmer *et al.*, 2006). Darüberhinaus geht diese morphologische auch mit einer funktionellen Identitätsvermischung von Golgi-Apparat und TGN einher. So sind nach der ConcA-Behandlung spezifische TGN-Marker wie SYP61 oder VHA-a1 nicht mehr nur im TGN, sondern auch vermehrt in Membranen von Golgi-Zisternen zu finden (Viotti *et al.*, 2010). Solche Proteinverschiebungen wiederum ziehen möglicherweise die beobachtbaren Störungen im endocytotischen und sekretorischen Membran- und Proteintransport nach sich. Vergleichbar mit dem Effekt in *det3*-Mutanten bewirkt auch die Behandlung mit ConcA einen verzögerten Transport von FM4-64 zum Tonoplasten (Dettmer *et al.*, 2006). Die längere

Behandlung mit ConcA führt darüberhinaus, ähnlich wie Brefeldin A, zur intrazellulären Akkumulation von FM4-64 zusammen mit sekretorischen Proteinen, wie dem Brassinosteroid-Rezeptor BRI1 (Viotti *et al.*, 2010), oder TGN-residierenden Proteinen, wie VHA-a1 oder COV1 (*Continuous Vascular Ring 1*; Shirakawa *et al.*, 2014). Diese Ergebnisse weisen somit Ähnlichkeit zu den in *TaLCT1*-exprimierenden Zellen zu beobachtenden Effekten auf, wie die intrazelluläre Aggregation von FM4-64 (Abb. 3.28 & 3.29) oder TGN-Markern (Abb. 3.27). Darüberhinaus könnte eine, wie nach ConcA-Behandlung, fortschreitende Aufhebung der räumlichen und funktionellen Trennung von Golgi und TGN auch den scheinbaren Übergang von *TaLCT1* vom Golgi zum TGN erklären (Abb. 3.26 & 3.27).

Monensin, ein weiterer Membrantransportinhibitor aus *Streptomyces cinnamonensis*, stört ebenfalls durch eine Alkalinisierung des intraluminalen pH-Werts die Morphologie und Funktion des Golgi/TGN (Mollenhauer *et al.*, 1990). Ähnlich wie für Brefeldin A konnte auch nach Behandlung mit Monensin eine Inhibition des polaren Auxintransports in Hypokotylzellen von Zucchini beobachtet werden. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auch hier, wie bei BFA, auf einer Störung des Transports von Auxintransportern von und zur Plasmamembran (Wilkinson & Morris, 1994; Morris & Robinson, 1998; Petrášek *et al.*, 2003). Im Unterschied zu ConcA, bei dem die Alkalinisierung, wie bereits erwähnt, durch eine Inhibition der V-ATPase verursacht wird, fungiert Monensin als  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter, welcher Natriumionen im Austausch von Protonen über biologische Membranen transportiert. Außerdem akkumuliert das Ionophor vermehrt in Sterol-reichen Membranen, weshalb es einen stärker inhibierenden Effekt auf den *trans*-Golgi und das TGN als auf den *cis*-Golgi hat, da dessen Membranen einen geringeren Sterolgehalt aufweisen (Dinter & Berger, 1998). Aufgrund dieser Eigenschaften weist Monensin somit möglicherweise einen ähnlichen Wirkmechanismus am Golgi/TGN auf, wie der, der für *TaLCT1* vorgeschlagen wird. Da allerdings Monensin, neben der Funktion des Golgi-Apparates, auch die Funktion von Mitochondrien beeinflusst (Mollenhauer *et al.*, 1990), sind auch abweichende Effekte in Pflanzen recht wahrscheinlich.

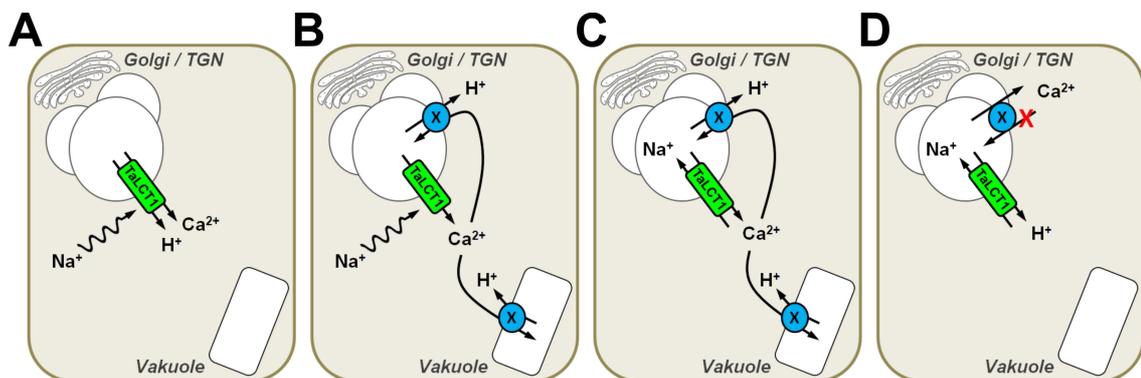
### 4.4.2. Beeinflussung der Calciumhomöostase durch *TaLCT1*

Neben dem bereits erwähnten Einfluss auf die pH-Homöostase konnte in transgenen *TaLCT1*- und *AEQUORIN*-exprimierenden Hefezellen auch eine Veränderung cytosolischer Calciumsignale nach der Behandlung mit NaCl beobachtet werden. Weiterhin zeigten die Versuche mit dem Calciumchelator EGTA, dass die Quelle dieser im Cytosol gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen intrazelluläre Speicher sind. Aufgrund der relativ hohen Calciumkonzentration von ca. 200-300  $\mu\text{M}$  im Golgi (Pinton *et al.*, 1998; Colinet *et al.*, 2016) sowie der Lokalisation von *TaLCT1* erscheint es möglich, dass *TaLCT1* die Freigabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Golgi-Lumen ins Cytosol

## Diskussion

vermittelt. Unklar ist allerdings, ob TaLCT1 selbst  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen transportiert oder ob es die Calciumfreisetzung indirekt vermittelt, beispielsweise durch eine Erhöhung des pH-Werts im Golgi-Lumen.

Das beobachtete Absinken des pH-Werts im Cytosol könnte durch einen TaLCT1-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Kotransport erklärt werden (Abb. 4.3.A). Wahrscheinlicher erscheint allerdings die zusätzliche Beteiligung vakuolärer oder Golgi-lokalisierter  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter wie VCX1 (*Vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Exchanger 1*; Miseta *et al.*, 1999) oder GDT1 (*Glycolysis Regulation 1 Dependent Translation Factor*; Demaegd *et al.*, 2013) (Abb. 4.3.B-D). Eine indirekte Calciumfreisetzung wäre ebenfalls denkbar. In diesem Fall würde TaLCT1, wie oben bereits diskutiert, als  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter eine Alkalinisierung des Golgi-Lumens verursachen. Die Folge wäre eine Schwächung der protonenmotorischen Kraft (*proton motive force*), die wiederum, reguliert über  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter, wie z.B. GDT1, essentiell für die Aufrechterhaltung der Calciumkonzentration im Golgi-Lumen ist (Abb. 4.3.D).



**Abbildung 4.3. Modelle für die Veränderung der cytosolischen Calcium- und pH-Homöostase durch TaLCT1 basierend auf den Ergebnissen der  $\text{Ca}^{2+}$ - und pH-Wertmessungen in Hefezellen.**

(A) Direkter,  $\text{Na}^+$ -stimulierter  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Kotransport durch TaLCT1 vom Golgi/TGN-Lumen in's Cytosol. (B) Direkte,  $\text{Na}^+$ -stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem Golgi/TGN-Lumen durch TaLCT1 und indirekte Protonenfreisetzung durch native  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter. (C) Direkter, TaLCT1-vermittelter  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiport und indirekte Protonenfreisetzung durch native  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter. (D) Direkter, TaLCT1-vermittelter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport bewirkt, durch Schwächung der protonenmotorischen Kraft, eine Hemmung des nativen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiports am Golgi/TGN.

Ein vergleichbarer Effekt ist auch für Azidokalzisomen - saure, calciumhaltige, vesikuläre Kompartimente - in *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit, beschrieben (Docampo *et al.*, 2005). So kann in diesen Zellen, verursacht durch die  $\text{Na}^+$ -Transportaktivität eines  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporters in den Membranen der Azidokalzisomen, ein Absinken des pH-Werts und ein Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol gemessen werden (Vercesi & Docampo, 1996). Die Daten zeigen weiterhin, dass die Ursache für beide Effekte eine durch die luminal Alkalinisierung hervorgerufene Calciumfreisetzung aus den Vesikeln ist. Auch hier wird die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiportern postuliert, die den bestehenden pH-Gradienten nutzen, um die Calciumkonzentration in den Azidokalzisomen aufrecht zu erhalten (Vercesi & Docampo, 1996). Ähnliche pH-abhängige Calciumfreisetzungen können

auch Bafilomycin A1 (inhibiert V-ATPasen ähnlich wie ConcA) und stärker noch Nigericin (funktioniert wie das Ionophor Monensin, aber mit höherer Spezifität für  $K^+$  als  $Na^+$ ) an sekretorischen Vesikeln chromaffiner Zellen auslösen (Camacho *et al.*, 2008). Weiterhin bewirkt die Calciumfreisetzung aus diesen Vesikeln eine Erhöhung ihrer Transportgeschwindigkeit und Exocytoserate. Eine Schlussfolgerung dieser Beobachtungen ist, dass intravesikuläres Calcium möglicherweise dem Aufbau cytosolischer Calciumgradienten im direkten, räumlichen Umfeld der Vesikel dient. Über solche pH-regulierten, lokalen „Calciummikrodomänen“, für die mehrere Beispiele beschrieben sind (Berridge, 2006), könnten dann Vesikeltransport und Membranfusionsprozesse gezielt reguliert werden (Camacho *et al.*, 2008).

In tierischen Zellen und Hefen wird die Calciumkonzentration im Endomembransystem durch ATPasen, wie beispielsweise SPCA1 (Secretory Pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1) oder PMR1 (Plasma Membrane ATPase-related 1) aufgebaut (Van *et al.*, 2003; Rudolph *et al.*, 1989). Für beide wurde gezeigt, dass ihre Funktion wichtig für den intrazellulären Membran- und Proteintransport ist (Micaroni *et al.*, 2010; Rudolph *et al.*, 1989; Antebi & Fink, 1992; Dürr *et al.*, 1998). In Pflanzen sind Ca<sup>2+</sup>-ATPasen vom ACA- (Autoinhibited Type IIB Ca<sup>2+</sup>-ATPase) und ECA-Typ (ER-type IIA Ca<sup>2+</sup>-ATPase) in ER, Golgi bzw. Endosomen lokalisiert (Liang & Sze, 1998; Sze *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Die Hemmung der Funktion dieser ATPasen mit spezifischen Inhibitoren wie Cyclopiazonsäure (CPA) oder Thapsigargin hat in *Lepidium sativum* (Gartenkresse) und *Arabidopsis thaliana* eine Störung des gravitropischen Wurzelwachstums zur Folge (Sievers & Busch, 1992; Urbina *et al.*, 2006). Auch eine signifikante Hemmung des Wurzellängenwachstums in Arabidopsis-Pflanzen nach der Behandlung mit  $\geq 5 \mu\text{M}$  CPA konnte in eigenen Versuchen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie SPCA1 und PMR1 scheinen auch die Ca<sup>2+</sup>-ATPasen in pflanzlichen Zellen wichtig für den Vesikeltransport im Endomembransystem zu sein. So bewirkt ihre Inhibition durch CPA die Aggregation von ER-Membranen sowie eine Veränderung der Golgi-Morphologie in Wurzelhaubenzellen von Lepidium-Pflanzen (Busch & Sievers, 1993). Somit ist nicht nur der luminale pH-Wert, sondern auch die geregelte Calciumhomöostase entscheidend für die korrekte Funktion des Endomembransystems.

Zwar ist unklar, wie sich die Calciumkonzentration in ER und Golgi-Apparat auf Auxin-assoziierte Wachstumsprozesse auswirkt, [Ca<sup>2+</sup>]-Messungen in Arabidopsis-Protoplasten mit Hilfe cytosolischen und Golgi-lokalisierten AEQUORINs, ergaben jedoch, dass nach Zugabe des synthetischen Auxinderivats 2,4-D ein Absinken der Konzentration freier Calciumionen im Golgi-Lumen sowie ein Anstieg der Calciumkonzentration im Cytosol zu beobachten ist (Ordenes *et al.*, 2012). Auch wenn nicht klar ist, ob diese beiden Beobachtungen in direktem Zusammenhang stehen, erscheint es möglich, dass Auxin durch Veränderungen luminaler und/oder cytosolischer Calciumkonzentrationen den intrazellulären V&MT beeinflusst. Dies selbst wiederum könnte dann direkten Einfluss auf den polaren Transport des

Phytohormons nehmen. Bekannt ist beispielsweise, dass Auxin die Endocytose und damit auch die Internalisierung von PIN-Transportern inhibiert, was wiederum einen anhaltenden Auxinefflux nach sich zieht (Paciorek *et al.*, 2005). Ob und inwiefern veränderte Calciumkonzentrationen hierbei eine Rolle spielen, ist jedoch nicht bekannt. Allerdings hat Calcium, wie in tierischen Zellen (s.o.), auch in Pflanzen einen stimulierenden Effekt auf Exocytose und Sekretion (Steer, 1988; Carroll *et al.*, 1998). Da auch Auxin stimulierend auf die Sekretion sowohl von Polysacchariden als auch Proteinen wirkt (Napier & Venis, 1995), erscheint es möglich, dass dieser Prozess Calcium-reguliert abläuft. In diesem Fall wiederum könnte Auxin-induzierter Auxinefflux sowohl über die inhibierte Internalisierung von PIN-Transportern, als auch deren verstärkte Sekretion ablaufen (Vanneste & Friml, 2013).

Insbesondere bei tierischen Zellen sowie Hefen wurde in zahlreichen Studien belegt, dass Calcium - auch indirekt über Calmodulin - an vielen intrazellulären Membrantransport- und -fusionsprozessen, wie beispielsweise beim intra-Golgi-Transport, der regulierten Exocytose oder der Fusion von Endosomen und Vakuolen, beteiligt ist (Burgoyne & Clague, 2003; Micaroni *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 1997; Peters & Mayer, 1998). Auch die homotypische Membranfusion am TGN von Hefezellen, an der u.a. auch die Proteine TLG1, TLG2 und VPS45 beteiligt sind, kann durch die Behandlung mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA inhibiert werden (Brickner *et al.*, 2001). Analog wird in tierischen Zellen die Fusion von Endosomen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatisierung mit BAPTA inhibiert (Holroyd *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Prozess durch Calmodulin und die Freigabe von intravesikulärem Calcium reguliert wird. Calcium-aktiviertes Calmodulin bindet wiederum an EEA1 (Early Endosomal Autoantigen 1), einem Interaktionspartner von Syntaxin 6 (Mills *et al.*, 2001), dem tierischen Homolog zu TLG1 aus der Hefe (Holthuis *et al.*, 1998b) und SYP61 aus Pflanzen (Sanderfoot *et al.*, 2001a). Da die Rolle von Calcium bei Membrantransport- und -fusionsprozessen in Pflanzen deutlich weniger gut untersucht ist, ist auch unbekannt, ob Fusionsprozesse, an denen SYP61 beteiligt ist, ebenfalls durch Calcium oder Calcium-bindende Proteine reguliert werden. Die Ergebnisse der Studien aus tierischen Zellen und Hefen (s.o.) lassen diese Möglichkeit aber durchaus zu. In diesem Fall könnte TaLCT1 durch die Veränderung von Calciumkonzentrationen über SYP61 (in Pflanzen) und TLG1 (in Hefen) unmittelbar Einfluss auf die Funktion des Golgi/TGN nehmen. Denkbar wäre aber auch, dass veränderte Calciumkonzentrationen andere Regulatoren des V&MTs beeinflussen und somit indirekt auch die durch SYP61 bzw. TLG1 regulierten Prozesse. In Pflanzen könnte beispielsweise durch eine gestörte Funktion der GTPase ARF1 (s.o.), die auch partiell mit SYP61 kolokalisiert (Stefano *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2011), wiederum die Funktion von SYP61 (und die mit ihm assoziierten Faktoren) beeinflusst werden. Dafür spricht, dass auch SYP61 nach Behandlung mit Brefeldin A in BFA-Kompartimenten aggregiert (Drakakaki *et al.*, 2012).

## Diskussion

---

Die Gruppe der ARF-GTPasen (inklusive der nahe verwandten ARL- (*Arf-Like*) und SAR- (*Secretion associated Ras-related*) GTPasen) bilden eine Gruppe wichtiger Membrantransportregulatoren, die in *A. thaliana* von 21 Genen kodiert werden (Vernoud *et al.*, 2003). Die Hauptaufgabe dieser GTPasen besteht in der Rekrutierung von COPI, COPII (*Coat Protein Complex I, II*) und Clathrin-Mantelproteinen für verschiedene Arten von Transportvesikeln. Wie andere GTPasen, wechseln auch die ARFs zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen, im Cytosol gelösten Form und einer aktiven, Membran-assoziierten, GTP-gebundenen Form. Der Übergang von der aktivierten in die inaktivierte Form geschieht über die Hydrolyse von GTP. Durch den Austausch von GDP durch GTP wird dagegen wieder in den aktivierten Zustand gewechselt (Vernoud *et al.*, 2003). Der Nukleotidaustausch wird hierbei von GEFs katalysiert, deren best-untersuchter Vertreter in Arabidopsis, wie bereits erwähnt, das GNOM-Protein ist (s.o.). Auch die Hydrolyse des GTPs wird nicht von der GTPase selbst, sondern durch GAPs (*GTPase-activating proteins*) katalysiert. Beide Faktoren, GEFs und GAPs, sind somit für die Funktion der GTPasen essentiell. Auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Vertreter dieser Regulatoren sind für verschiedene GTPasen beschrieben (z.B. Aspenström, 2004). Jüngere Studien aus *Dictyostelium discoideum* zeigen auch, dass einige GAPs spezifisch durch die Entlassung vesikulären Calciums reguliert werden. Die Calciumfreigabe über den vesikulären Calciumkanal P2XA aktiviert CnrF, ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges RAB-GAP. Dieses wiederum inaktiviert die GTPase RAB11a, wodurch die Fusion von Vesikeln und Vakuolen ermöglicht wird (Parkinson *et al.*, 2014). Inwieweit diese Ergebnisse generell auch auf andere GTPasen und ihre Regulatoren übertragen werden können, ist allerdings nicht bekannt.

Arabidopsis besitzt insgesamt 15 Proteine, die ARF-GAP Zink-Finger Domänen (AGD) ausbilden. Drei dieser 15 Proteine (AtAGD11-13) besitzen darüberhinaus eine zentral gelegene C2-Domäne, welche eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion mit Membranen, Phospholipiden und anderen Proteinen ermöglicht (Nalefski & Falke, 1996; Vernoud *et al.*, 2003). Für eines dieser drei ARF-GAPs aus Arabidopsis, ZAC (*zink and calcium-binding*), konnte *in vitro*  $\text{Ca}^{2+}$ -modulierbare Phospholipidbindung und ARF-abhängige GTP-Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden. GFP-Fusionen und Membranfraktionierungen zeigen zudem eine Kollokalisierung des ZAC-Proteins mit Golgi- und Plasmamembranmarkern (Jensen *et al.*, 2000). Die heterologe Expression von OsAGAP, einem ZAC Homolog aus Reis, führt in Arabidopsis zu Auxin-assoziierten Wachstumsdefekten, wie inhibiertem Primärwurzelwachstum und verzögertem Wurzelgravitropismus (Zhuang *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie zeigte sich, dass der veränderte Auxintransport in diesen Pflanzen sowie die daraus resultierenden Phänotypen sehr wahrscheinlich auf eine fehlerhafte Lokalisation des Auxintransporters AUX1 zurückgeführt werden können. Statt in der Plasmamembran war AUX1 in den OsAGAP-exprimierenden Mutanten in cytoplasmatischen Strukturen aggregiert. Die subzelluläre Lokalisation von PIN1 und PIN2 war dagegen nicht

betroffen (Zhuang *et al.*, 2006). Ähnliche Aggregationen wie in Arabidopsis, die in ihrer Morphologie an BFA-Kompartimente (s.o.) erinnern, konnten auch in *OsAGAP*-überexprimierenden Reispflanzen nach Zugabe des Membranfarbstoffs FM4-64 beobachtet werden (Zhuang *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ARF-GAPs u.a. im Transport von Auxintransportern involviert sind. Zwar scheint *OsAGAP*, eventuell genau wie sein Homolog ZAC, spezifisch am Transport von AUX1 beteiligt zu sein, allerdings gibt es in Arabidopsis, wie bereits erwähnt, noch zwei weitere, bisher nicht näher charakterisierte ARF-GAPs mit C2-Domänen. Diese sind möglicherweise in der spezifischen Regulation des polaren PIN-Transports zur Plasmamembran beteiligt.

Eine weitere Verbindung zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Regulation und Membrantransport in Pflanzen existiert mit der Gruppe der Phospholipasen (Yao & Xue, 2011; Scherer *et al.*, 2012). Phospholipasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Phospholipiden katalysieren. In Abhängigkeit von der Esterbindung im Phospholipidmolekül, deren Spaltung sie katalysieren, werden die Enzyme in vier große Gruppen ( $\text{PLA}_{1/2}$ , PLB, PLC und PLD) mit zahlreichen Untergruppen eingeteilt (Wang, 2001). Ihre katalytische Aktivität reguliert u.a. die Produktion lipophiler Molekülverbindungen, die als sekundäre Botenstoffe in diversen physiologischen Prozessen (z.B. Wachstumsregulation, Stressverarbeitung) involviert sind (Xue *et al.*, 2009). Auch an Auxin-abhängigen Wachstumsprozessen sind Phospholipasen beteiligt. So zeigen beispielsweise *pldζ2*-Nullmutanten und *PLDζ2*-überexprimierende Arabidopsis-Pflanzen Defekte im Hypokotylwachstum bei erhöhten Temperaturen, gestörtes gravotropisches Wachstum der Wurzel oder veränderte *DR5::GUS*-Expression in Blatt- und Wurzelspitzen. Darüberhinaus sind *PLDζ2* sowie ihr Reaktionsprodukt, Phosphatidsäure (PA), am zyklischen PIN-Vesikeltransport von und zur Plasmamembran beteiligt (Li & Xue, 2007). Zwar sind mehrere Phospholipasen der Gruppe D durch  $\text{Ca}^{2+}$ -reguliert, ob dies allerdings auch auf *PLDζ2* zutrifft, ist bisher nicht untersucht (Li *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2012).

Im Gegensatz dazu konnte für die niedermolekularen sekretorischen Phospholipasen der Gruppe  $A_2$  aus Arabidopsis ( $\text{PLA}_2$  oder  $\text{sPLA}_2$ ) experimentell bestätigt werden, dass ihre Aktivität durch verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, aber auch pH-Werte moduliert wird (Ryu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2013). Die chemische Aktivität der  $A_2$ -Phospholipasen besteht in der hydrolytischen Spaltung der Esterbindungen von Membranphospholipiden (z.B. Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylcholin) am zweiten C-Atom des Glycerols, was in der Bildung freier Fettsäuren und Lysophospholipiden resultiert (Chen *et al.*, 2013). Auch die  $\text{PLA}_2$ -Enzyme sind seit Jahren als Regulatoren von Membrantransport und -fusion bekannt. Die Regulation dieser Prozesse findet hierbei sowohl durch die Modifikation der Membranlipide, wie auch durch die ebenfalls gebildeten freien Fettsäuren statt, welche wiederum die Funktion von SNARE-Proteinen beeinflussen (Brown *et al.*, 2003; Davletov *et al.*, 2007). So stimulieren in tierischen Zellen Arachidonsäure, aber auch

Linol- und Linolensäure - beides Produkte PLA<sub>2</sub>-katalysierter Phospholipidhydrolyse in Pflanzen - über MUNC18, einem tierischen VPS45-Homolog, die Formierung von SNARE-Komplexen (Rickman & Davletov, 2005). Ähnliche Vorgänge sind auch in pflanzlichen Zellen denkbar.

Die sekretorische Phospholipase A<sub>2</sub> hat in Arabidopsis vier Isoformen (gekennzeichnet durch die griechischen Buchstaben  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ), die alle konservierte Ca<sup>2+</sup>-bindende Aminosäuremotive besitzen (Ryu *et al.*, 2005; Mansfeld *et al.*, 2006). Auch für diese Phospholipasen konnte eine Rolle beim polaren Transport von Auxintransportern zur Plasmamembran aufgezeigt werden. So bewirkt die pharmakologische Inhibition der sPLA<sub>2</sub>-Enzyme mithilfe des spezifischen Inhibitors ONO-RS-082 (2-[*p*-Amylcinnamoyl]-Amino-4-Chlorbenzoesäure) in Wurzelzellen neben einer Veränderung der normalen Golgi/TGN-Morphologie auch eine intrazelluläre Aggregation von PIN-Transportern und FM4-64. Die Prüfung der enzymatischen Aktivitäten zeigt, dass ONO-RS-082 vor allem die Aktivität der Isoform PLA<sub>2</sub> $\alpha$  inhibiert (Lee *et al.*, 2010). Dafür spricht auch, dass eine vergleichbare Aggregation von PIN-Transportern auch in *pla<sub>2</sub> $\alpha$* -Mutanten zu beobachten ist. Über die Fusion mit fluoreszierenden Proteinen konnten die Isoformen PLA<sub>2</sub> $\alpha$  im Golgi, PLA<sub>2</sub> $\beta$  und  $\delta$  im ER, und PLA<sub>2</sub> $\gamma$  im Golgi sowie ER lokalisiert werden (Lee *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Während allerdings PLA<sub>2</sub> $\alpha$  eher in der Regulation des Wachstums von Wurzel und Wurzelhaaren involviert zu sein scheint, sind für *PLA<sub>2</sub> $\beta$* -Mutanten Störungen des Gravitropismus und des Zellstreckungswachstums in Hypokotyl und Infloreszenz beschrieben. Auch diese Phänotypen werden mit Veränderungen der Auxin-Homöostase oder des Auxin-Signallings in Verbindung gebracht (Lee *et al.*, 2003).

Aktinfilamente und Mikrotubuli, Komponenten des Cytoskeletts, sind ebenfalls als Ca<sup>2+</sup>- und pH-regulierte, für den intrazellulären V&MT wichtige Faktoren beschrieben (Kamal & Goldstein, 2000; Brandizzi & Wasteneys, 2013; Hepler, 2016). Im Falle von Aktin wirkt Calcium einerseits inhibierend auf die Filamentpolymerisation und andererseits stimulierend auf die Fragmentierung und Depolymerisation über Aktin-bindende Proteine wie Villin, Gelsolin oder ADFs (Actin-Depolymerizing Factors).

Ähnlich wie bei Aktinfilamenten führen erhöhte Calciumkonzentrationen (> 1  $\mu$ M) bei Anwesenheit von Calmodulin auch bei Mikrotubuli zu einer verstärkten Depolymerisation und zur Inhibierung der Polymerisation (Marcum *et al.*, 1978; Hepler, 2016). Die pharmakologisch induzierte Depolymerisation sowohl der Aktinfilamente, als auch der Mikrotubuli mit Latrunculin B (LatB) bzw. Oryzalin bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation von PIN- und AUX-Transportern sowie die Störung ihrer polaren Plasmamembran-Lokalisation (Kleine-Vehn *et al.*, 2006; Kleine-Vehn *et al.*, 2008). Dies wiederum führt vermutlich, insbesondere bei Behandlung mit LatB, zu inhibiertem Wurzelwachstum und verändertem Wurzelgravitropismus (Hou *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2004). Auch die durch Calcium bzw. Calmodulin gesteuerte Funktion von Myosin-



Beteiligung an Auxin-assoziierten Prozessen in Wachstum und Entwicklung hin (Baucher *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2016). Welche genaue Rolle sie hierbei spielen, ist jedoch noch nicht bekannt.

### 4.5. Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den Effekten von TaLCT1 und HvLCT2

Die ersten Ergebnisse der funktionellen Analyse von *HvLCT2* in transformierten Hefezellen deuten auf Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den beiden untersuchten LCTs. Beispielsweise zeigen sowohl *TaLCT1*- als auch *HvLCT2*-exprimierende G19-Hefezellen erhöhte, Calcium- und pH-abhängige Sensitivität gegenüber NaCl (Anhang Abb. 8.4 & Abb. 8.5). Dagegen wurde ein anderer *TaLCT1*-Phänotyp, Hypersensitivität gegenüber hohen Calciumkonzentrationen, in *HvLCT2*-exprimierenden Zellen nicht beobachtet (Abb. 3.42). Die strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine (Abb. 3.41) spricht dafür, dass beide Proteine grundsätzlich über den gleichen Wirkmechanismus als Kationentransporter in Endomembranen arbeiten. Der offenkundigste Unterschied, und damit auch eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen, liegt in der subzellulären Lokalisation beider Proteine, sowohl in Hefen als auch in pflanzlichen Zellen. Während *TaLCT1* in Golgi- und/oder *post*-Golgi-Kompartimenten lokalisiert ist (Abb. 3.35), ist *HvLCT2* in Membranen des endoplasmatischen Retikulums und des Kerns zu finden (Abb. 3.43). Mit dieser subzellulären Lokalisation reihen sich *TaLCT1* und *HvLCT2* in die Gruppe zahlreicher in Endomembranen der sekretorischen und endosomalen Transportwege lokalisierter Kationentransporter ein. So sind beispielsweise mit HAK2 und HAK3 zwei hoch-affine Kaliumtransporter im Golgi-Apparat und ER von Zellen des Mooses *Physcomitrella patens* beschrieben (Haro *et al.*, 2013). Auch TRH1 (*Tiny Root Hairs 1*) aus Arabidopsis, gleichfalls aus der Familie der HAK-Transporter, ist überwiegend in Endomembranen (höchstwahrscheinlich ER) lokalisiert (Rigas *et al.*, 2013; Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Verschiedene Mitglieder der großen Familie der *Cation/H<sup>+</sup>-Exchanger* (CHX) befinden sich ebenfalls im ER, aber auch in späten endosomalen Kompartimenten (Chanroj *et al.*, 2011). Die *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger* NHX5 und NHX6 sind dagegen in frühen Endosomen/TGN und im Golgi-Apparat lokalisiert (Bassil *et al.*, 2011). Neben diesen Transportern für monovalente Kationen sind aber auch diverse Mangan-, Zink- und Calciumtransporter der CDF/MTP- (*Cation-Diffusion-Facilitator / Metal Tolerance Protein*), CAX- (*Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger*) und UPF0016/GDT- (*Uncharacterized Protein Family 0016 / Glycolysis Regulation 1 Dependent Translation Factor*) Proteinfamilien in Golgi- und *post*-Golgi-Kompartimenten zu finden (Peiter *et al.*, 2007; Delhaize *et al.*, 2007; Pedas *et al.*, 2014; Fujiwara *et al.*, 2015; Ueoka-Nakanishi *et al.*, 2000; Demaegd *et al.*, 2013; Demaegd *et al.*, 2014). Neben den Endomembran-assoziierten Vertretern haben viele der erwähnten Transporterfamilien auch Mitglieder, die in der Plasmamembran oder dem Tonoplasten lokalisiert sind (z.B.

Chanroj *et al.*, 2012; Nieves-Cordones *et al.*, 2016). Die vakuolären und Plasmamembran-lokaliserten Transporter scheinen in den meisten Fällen der Aufnahme und Speicherung von Mineralstoffen (z.B.  $K^+$ -Aufnahme durch CHX13 oder HAK5; Zhao *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2008) bzw. der Entgiftung toxischer Ionen zu dienen (z.B.  $Na^+$ - oder  $Li^+$ -Export durch SOS1/NHX7 oder NHX8; Shi *et al.*, 2000; An *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu scheinen die ER-, Golgi- und *post*-Golgi-lokaliserten Transporter wichtige Regulatoren bestimmter Funktionen des Endomembransystems zu sein (z.B. NHX5 & 6, CHX17, HAK2 & 3; Bassil *et al.*, 2011; Chanroj *et al.*, 2011; Haro *et al.*, 2013).

Die Lokalisation der LCTs in unterschiedlichen Membranen ist möglicherweise durch den hydrophilen N-Terminus bei TaLCT1 zu erklären, der in HvLCT2, und auch in OsLCT1 aus Reis (Uraguchi *et al.*, 2011), nicht vorhanden ist (Abb. 3.41 & 3.40.B und C). Amtmann *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Entfernung dieses N-Terminus zu einer signifikanten Reduktion der Salzsensitivität in G19-Hefezellen führt, die allerdings immer noch höher war als bei Leervektor-transformierten Kontrollzellen. Auch bei *HvLCT2*-Zellen war der Effekt erhöhter Salzsensitivität geringer als bei *TaLCT1*-Zellen (Abb. 3.42.A). Weiterhin bewirkte die Expression der verkürzten *TaLCT1*-Versionen auch eine Reduktion der Calciumakkumulation, die aber auch hier immer noch höher war, als die der Kontrollzellen (Amtmann *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigten *HvLCT2*-Hefen weder erhöhte Calciumakkumulation (Daten nicht gezeigt) noch veränderte Sensitivität gegenüber erhöhten Calciumkonzentrationen (Abb. 3.42.B). Aufgrund dieses Unterschiedes ist unklar, ob der fehlende N-Terminus bei TaLCT1 tatsächlich, wie bei HvLCT2, zu einer Veränderung der Lokalisation vom Golgi hin zum ER führt, oder ob die Verringerung der Salzsensitivität lediglich durch eine verminderte TaLCT1-Aktivität im Golgi/TGN hervorgerufen wird. Denkbar wäre ebenfalls, dass sich TaLCT1 durch die Entfernung des N-Terminus nicht vollständig, sondern nur teilweise ins ER verschiebt. Dies könnte beispielsweise durch die Fusion einer N-terminal verkürzten *TaLCT1*-cDNA mit *GFP* oder *YFP* getestet werden. Auch wäre interessant zu überprüfen, ob sich die Lokalisation von HvLCT2 durch eine Fusion mit dem N-Terminus von *TaLCT1* vom ER zum Golgi/TGN verändern würde und ob dies dann beispielsweise auch zu einer erhöhten Calciumakkumulation und Calciumsensitivität der Hefen führen würde.

### 5. Zusammenfassung

Der Transport von Kationen über biologische Membranen spielt eine wichtige Rolle bei der Stresstoleranz von Pflanzen. Im Fall von Salzstress dient der Transport von  $\text{Na}^+$  in zelluläre Kompartimente bzw. den Apoplasten der Vermeidung toxischer Ionenkonzentrationen im Cytosol. Weiterhin ist als eine initiale Antwort auf die meisten biotischen und abiotischen Stressoren ein verstärkter Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intra- bzw. extrazellulären Calciumspeichern in das Cytosol zu beobachten. Diese transienten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ -Signale fungieren als Auslöser für molekulare Signalkaskaden und der weiteren Verarbeitung des Stresses. Das bisherige Wissen über diese Prozesse beruht zum überwiegenden Teil auf den Untersuchungen an *Arabidopsis*. Dagegen ist vergleichsweise wenig über die entsprechenden Mechanismen in monokotylen Nutzpflanzen, wie Weizen oder Gerste, bekannt.

Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Arbeit mit einer Monokotyledonen-spezifischen Genfamilie, den *Low-affinity Cation Transportern (LCTs)*, die in dikotylen Spezies, inklusive *Arabidopsis*, nicht existiert. Ein Mitglied dieser Familie aus Reis, OsLCT1, wurde als Plasmamembran-lokalisierter Cadmium-Transporter beschrieben, der neben  $\text{Cd}^{2+}$  auch für andere Kationen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  oder  $\text{K}^+$ , permeabel zu sein scheint. Auch für TaLCT1 aus Weizen, dem Hauptgegenstand dieser Arbeit, wurde, basierend auf den Ergebnissen früherer Studien, ein ähnliches Wirkprinzip und eine Lokalisierung in der Plasmamembran postuliert. Dies wurde bisher jedoch in keiner Studie direkt gezeigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass das bisherige Modell der Funktion von TaLCT1 überdacht werden muss. So zeigte sich, dass EYFP-fusioniertes TaLCT1 bei homologer Expression in Weizen-Protoplasten, sowie bei heterologer Expression in Tabak, *Arabidopsis* und Hefe in Membranen Golgi/TGN-assoziiierter Kompartimente akkumuliert. Weiterhin kann anhand der neu gewonnenen Erkenntnisse auf eine Beteiligung des Proteins bei der Regulation des Vesikel- und Membrantransports (V&MT) am Golgi-Apparat und dem TGN geschlossen werden. Die Ergebnisse von  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ - und  $\text{pH}_{\text{cyt}}$ -Messungen an transformierten Hefezellen lassen vermuten, dass TaLCT1 durch Verlagerung von Protonen und/oder Calciumionen ins Cytosol und/oder das Lumen des Golgi/TGN regulatorisch auf solche Prozesse einwirkt. Wie Literaturbeispiele zeigen, könnten Störungen dieser endogenen Mechanismen ebenfalls die in *TaLCT1*-transformierten Hefezellen zu beobachtenden Veränderungen der Kationen-Homöostase erklären.

Mehrere bisherige Studien machen deutlich, dass der pH-Wert und Calcium nicht nur in tierischen Zellen und Hefen, sondern ebenso in Pflanzen wichtige Regulatoren des intrazellulären V&MTs sind. So ziehen Änderungen der Funktion  $\text{Ca}^{2+}$ - und/oder pH-abhängiger V&MT-regulierender Faktoren, hervorgerufen durch Mutationen oder pharmakologische Behandlungen, Phänotypen nach sich, die denen *TaLCT1*-

## Zusammenfassung

---

exprimierender Arabidopsis-Pflanzen in vielen Punkten ähneln. Neben einer Verringerung der Salztoleranz konnten in diesen Pflanzen ein inhibiertes Keimlings- und Wurzelwachstum sowie Wurzelgravitropismus beobachtet werden. Durch Kreuzung *TaLCT1*-exprimierender Pflanzen mit *DR5::GUS*-Reporterpflanzen konnten diese Phänotypen auf eine Veränderung der Homöostase des Phytohormons Auxin zurückgeführt werden. Dies wiederum scheint, zumindest teilweise, mit einer Mislokalisierung des Auxintransporters PIN1 in Verbindung zu stehen. Gestützt durch das Vorhandensein mehrerer putativer *Auxin Responsive Elements* (AuxREs) in der Promotorregion des Gens ergibt sich für *TaLCT1* auch im Weizen eine mögliche Beteiligung an der Regulation der korrekten Lokalisierung von PIN-Proteinen und/oder anderen Auxintransportern.

Als ein Nebenaspekt der vorliegenden Arbeit konnte ein weiteres, bisher nicht beschriebenes, Mitglied der *LCT*-Familie, *HvLCT2*, aus Gerste identifiziert und teilweise charakterisiert werden. Erste bioinformatische und funktionelle Analysen deuten auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen *TaLCT1* und *HvLCT2* hin. So induzierte *HvLCT2* ebenso wie *TaLCT1* zwar eine verstärkte  $\text{Na}^+$ -Sensitivität in transformierten Hefezellen, eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität wie in *TaLCT1*-exprimierenden Zellen war aber nicht zu beobachten. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Unterschiede liegt in der Lokalisierung beider Proteine, die für *HvLCT2*, durch Fusion mit EYFP, in Gerste-Protoplasten, Tabak- und Hefezellen eine Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum und Kernmembranen ergab. Ähnlich wie für *TaLCT1*, ist auch für *HvLCT2* eine Beteiligung an V&MT-Prozessen an Endomembran-Kompartimenten denkbar.

Zusammenfassend ergibt sich somit für die *LCTs* ein ähnliches Bild wie für andere Kationentransporterfamilien in Pflanzen, wie z.B. die *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger* (*NHX*) oder die *Cation/H<sup>+</sup>-Exchanger* (*CHX*), bei denen einzelne Mitglieder ebenfalls in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert sind und dort unterschiedlichste physiologische Aufgaben übernehmen. Da jedoch die Aussagekraft heterologer Expressionsversuche, trotz vieler neu gewonnener Erkenntnisse und Ansätze zur Funktion von *LCT*-Proteinen, begrenzt ist, erscheint in Zukunft als wichtigster nächster Schritt für die Charakterisierung von *TaLCT1* und *HvLCT2* deren direkte Untersuchung in Weizen bzw. Gerste. Als Werkzeuge hierfür könnten durch Genomeditierungs-Strategien generierte, mis-exprimierende Pflanzen dienen.

### 6. Summary

The transport of cations across biological membranes is crucial for stress tolerance of plants. During salt stress, for instance, transport of  $\text{Na}^+$  ions into cellular compartments or the apoplast is necessary to avoid toxic concentrations in the cytosol. Also, an initial response to most biotic and abiotic stresses is the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  ions from intra- and extracellular calcium stores to the cytosol. Transient  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  increases function as trigger for molecular signal cascades and the subsequent stress responses. Our understanding of those processes is largely derived from the analysis of Arabidopsis. On the other hand, still little is known about the corresponding mechanisms in agriculturally important monocot plants, such as wheat or barley.

For this reason this thesis is concerned with a monocot-specific gene family, the *Low-affinity Cation Transporters (LCTs)*, which is not existent in dicot species, including Arabidopsis. One member of this family from rice, OsLCT1, has been described as plasmamembrane-localized  $\text{Cd}^{2+}$  transporter, which may also be permeable for other cations such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  or  $\text{K}^+$ . For TaLCT1, the main subject of this thesis, a similar mode of action as well as a localization to the plasmamembrane has been postulated, but was never directly shown.

The results shown in this thesis indicate that the current model of TaLCT1 function has to be reconsidered. It is shown that TaLCT1 fused to EYFP is localized to a Golgi-/TGN-related compartment in wheat protoplasts, tobacco, Arabidopsis, and yeast cells. Moreover the results suggest that TaLCT1 is involved in the regulation of vesicle and membrane trafficking (V&MT) at the Golgi and the TGN.  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ - and  $\text{pH}_{\text{cyt}}$ -measurements suggest that TaLCT1 affects such processes by translocation of protons and/or  $\text{Ca}^{2+}$  ions to the cytosol and/or the lumen of the Golgi/TGN. According to the literature, perturbations of such endogenous mechanisms may also explain the altered cation homeostasis observed in *TaLCT1*-expressing yeast cells.

Many previous studies indicate a role for pH and  $\text{Ca}^{2+}$  as important regulators of V&MT not only in animals and yeast cells, but also in plants. Manipulating the function of  $\text{Ca}^{2+}$ - and/or pH-dependent V&MT-regulators by mutation or pharmacological treatment results in phenotypes similar to those observed in *TaLCT1*-expressing Arabidopsis plants. Next to reduced salt tolerance, the plants exhibit inhibited seedling and root growth, as well as root agravitropism. By crossing *TaLCT1*-expressing plants with *DR5::GUS* reporter plants, these phenotypes were associated with changes in auxin homeostasis. This was at least partially linked to a mislocalization of the auxin transporter PIN1. Supported by the existence of many putative *auxin responsive elements (AuxREs)* in the promoter region of the gene, a role for TaLCT1 in the regulation of PIN trafficking in wheat appears possible.

As a side aspect of this study, a further, yet unknown, member of the *LCT* family, *HvLCT2*, could be identified in barley and was partially characterized. Initial

## Summary

---

bioinformatic and functional analyses point to similarities and differences between *TaLCT1* and *HvLCT2*. Comparable to *TaLCT1*, *HvLCT2* aggravated the  $\text{Na}^+$  sensitivity in transformed yeast cells. On the other hand, those cells did not show the increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity found in *TaLCT1*-transformed cells. The most likely explanation for those differences is the different subcellular localization of both proteins. Fusion of *HvLCT2* to EYFP indicates its accumulation in membranes of the endoplasmic reticulum and the nucleus. Similar to *TaLCT1*, a role for *HvLCT2* in regulating V&MT at endomembranous compartments is conceivable.

Collectively, the results suggest that *LCTs* share characteristics with other families of cation transporters in plants, such as *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers (NHXs)* or *Cation/H<sup>+</sup> Exchangers (CHXs)*. Individual members of those families also localize to various cellular compartments and play roles in different physiological processes. Despite the new and interesting findings on functions of *LCT* proteins, the information obtainable from heterologous expression experiments is limited. Therefore the major focus in future studies should lie on the characterization of *TaLCT1* and *HvLCT2* in wheat and barley. Mis-expressing plants, generated by genome editing strategies, may be appropriate tools for such studies.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aaij C, Borst P** (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* **269**, 192-200.
- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wirniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C** (2006). Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nature Cell Biology* **8**, 249-256.
- Abel S, Nguyen MD, Theologis A** (1995). The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible messenger-RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology* **251**, 533-549.
- Abel S, Theologis A** (1994). Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant Journal* **5**, 421-427.
- Abeliovich H, Grote E, Novick P, Ferro-Novick S** (1998). Tlg2p, a yeast syntaxin homolog that resides on the golgi and endocytic structures. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 11719-11727.
- Alabi AA, Tsien RW** (2013). Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annual Review of Physiology* **75**, 393-422.
- Alés E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, varez de TG** (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature Cell Biology* **1**, 40-44.
- Alijo R, Ramos J** (1993). Several routes of activation of the potassium uptake system of yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* **1179**, 224-228.
- Allen DG, Blinks JR, Prendergast FG** (1977). Aequorin luminescence - relation of light-emission to calcium concentration - calcium-independent component. *Science* **195**, 996-998.
- Allen GJ, Muir SR, Sanders D** (1995). Release of Ca<sup>2+</sup> from individual plant vacuoles by both InsP(3) and cyclic ADP-Ribose. *Science* **268**, 735-737.
- Amtmann A, Fischer M, Marsh EL, Stefanovic A, Sanders D, Schachtman DP** (2001). The wheat cDNA *LCT1* generates hypersensitivity to sodium in a salt-sensitive yeast strain. *Plant Physiology* **126**, 1061-1071.
- An R, Chen QJ, Chai MF, Lu PL, Su Z, Qin ZX, Chen J, Wang XC** (2007). AtNHX8, a member of the monovalent cation : proton antiporter-1 family in *Arabidopsis thaliana*, encodes a putative Li<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Plant Journal* **49**, 718-728.
- Antebi A, Fink GR** (1992). The yeast Ca<sup>2+</sup>-ATPase homolog, PMR1, is required for normal golgi function and localizes in a novel golgi-like distribution. *Molecular Biology of the Cell* **3**, 633-654.
- Antosiewicz DM, Hennig J** (2004). Overexpression of *LCT1* in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity. *Environmental Pollution* **129**, 237-245.

- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E** (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Arabidopsis. *Science* **285**, 1256-1258.
- Ariño J, Ramos J, Sychrova H** (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**, 95-120.
- Aspenström P** (2004). Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta* **1742**, 51-58.
- Auesukaree C, Damnernsawad A, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Boonchird C, Kaneko Y, Harashima S** (2009). Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Genetics* **50**, 301-310.
- Bagnat M, Chang A, Simons K** (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 4129-4138.
- Bagnat M, Simons K** (2002). Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **383**, 1475-1480.
- Balzan S, Johal G, Carraro N** (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science* **5**, 1-12.
- Bañuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S** (1998). The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology-UK* **144**, 2749-2758.
- Baral A, Shruthi KS, Mathew MK** (2015). Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **67**, 677-686.
- Bassham DC, Raikhel NV** (1998). An Arabidopsis VPS45p homolog implicated in protein transport to the vacuole. *Plant Physiology* **117**, 407-415.
- Bassham DC, Sanderfoot AA, Kovaleva V, Zheng HY, Raikhel NV** (2000). AtVPS45 complex formation at the trans-golgi network. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2251-2265.
- Bassil E, Ohto MA, Esumi T, Tajima H, Zhu Z, Cagnac O, Belmonte M, Peleg Z, Yamaguchi T, Blumwald E** (2011). The Arabidopsis intracellular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell* **23**, 224-239.
- Batiza AF, Schulz T, Masson PH** (1996). Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 23357-23362.
- Baucher M, Oukouomi LY, Vandeputte OM, Mukoko BJ, Moussawi J, Vermeersch M, Mol A, El JM, Homble F, Perez-Morga D** (2011). Ntann12 annexin expression is induced by auxin in tobacco roots. *Journal of Experimental Botany* **62**, 4055-4065.
- Becherer KA, Rieder SE, Emr SD, Jones EW** (1996). Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **7**, 579-594.

- Benjamins R, Ampudia CSG, Hooykaas PJJ, Offringa R** (2003). PINOID-mediated signaling involves calcium-binding proteins. *Plant Physiology* **132**, 1623-1630.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA** (1996). Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**, 948-950.
- Berridge MJ** (2006). Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* **40**, 405-412.
- Bertl A, Bihler H, Reid JD, Kettner C, Slayman CL** (1998). Physiological characterization of the yeast plasma membrane outward rectifying K<sup>+</sup> channel, DUK1 (TOK1), *in situ*. *Journal of Membrane Biology* **162**, 67-80.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A** (1998). NSC1: a novel high-current inward rectifier for cations in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **432**, 59-64.
- Bihler H, Slayman CL, Bertl A** (2002). Low-affinity potassium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1558**, 109-118.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS** (2007). Interactions among PINFORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 131-147.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP** (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1465**, 140-151.
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B** (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy* **214**, 159-173.
- Bouche N, Scharlat A, Snedden W, Bouchez D, Fromm H** (2002). A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 21851-21861.
- Bouché N, Yellin A, Snedden WA, Fromm H** (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 435-466.
- Brandizzi F, Wasteneys GO** (2013). Cytoskeleton-dependent endomembrane organization in plant cells: an emerging role for microtubules. *Plant Journal* **75**, 339-349.
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeiffer M, Barker GLA, D'Amore R, Allen AM, McKenzie N, Kramer M, Kerhornou A, Bolser DKS, Waite D, Trick MBI, Gu Y,**

- Huo N, Luo M-C, Sehgal S, Gill, B., Kianian S, Anderson O, Kersey P, Dvorak J, McCombie WR, Hall A, Mayer MFX, Hall N, Edwards KJ, Bevan MW, Hall N** (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* **491**, 705-710.
- Brickner JH, Blanchette JM, Sipos G, Fuller RS** (2001). The Tlg SNARE complex is required for TGN homotypic fusion. *Journal of Cell Biology* **155**, 969-978.
- Brown WJ, Chambers K, Doody A** (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* **4**, 214-221.
- Burgoyne RD, Clague MJ** (2003). Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1641**, 137-143.
- Busch MB, Sievers A** (1993). Membrane traffic from the endoplasmic reticulum to the golgi apparatus is disturbed by an Inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the ER. *Protoplasma* **177**, 23-31.
- Camacho M, Machado JD, Alvarez J, Borges R** (2008). Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles - a study with adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22383-22389.
- Carroll AD, Moyen C, Van KP, Tooke F, Battey NH, Brownlee C** (1998). Ca<sup>2+</sup>, annexins, and GTP modulate exocytosis from maize root cap protoplasts. *Plant Cell* **10**, 1267-1276.
- Cazzonelli CI, Vanstraelen M, Simon S, Yin KD, Carron-Arthur A, Nisar N, Tarle G, Cuttriss AJ, Searle IR, Benkova E, Mathesius U, Masle J, Friml J, Pogson BJ** (2013). Role of the Arabidopsis PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development. *PLOS ONE* **8**.
- Chanroj S, Lu YX, Padmanaban S, Nanatani K, Uozumi N, Rao R, Sze H** (2011). Plant-specific cation/H<sup>+</sup> exchanger 17 and its homologs are endomembrane K<sup>+</sup> transporters with roles in protein sorting. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 33931-33941.
- Chanroj S, Wang GY, Venema K, Zhang MW, Delwiche CF, Sze H** (2012). Conserved and diversified gene families of monovalent cation/H<sup>+</sup> antiporters from algae to flowering plants. *Frontiers in Plant Science* **3**.
- Charpentier M, Sun J, Vaz MT, Radhakrishnan GV, Findlay K, Soumpourou E, Thouin J, Very AA, Sanders D, Morris RJ, Oldroyd GE** (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* **352**, 1102-1105.
- Chen G, Greer MS, Weselake RJ** (2013). Plant phospholipase A: advances in molecular biology, biochemistry, and cellular function. *Biomolecular Concepts* **4**, 527-532.
- Chen J, Mao L, Mi H, Lu W, Ying T, Luo Z** (2016). Involvement of three annexin genes in the ripening of strawberry fruit regulated by phytohormone and calcium signal transduction. *Plant Cell Reports* **35**, 733-743.
- Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschman JE, Hitz BC,**

- Karra K, Krieger CJ, Miyasato SR, Nash RS, Park J, Skrzypek MS, Simison M, Weng S, Wong ED** (2012). Saccharomyces genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research* **40**, 700-705.
- Chin K, DeFalco TA, Moeder W, Yoshioka K** (2013). The Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channels AtCNGC2 and AtCNGC4 work in the same signaling pathway to regulate pathogen defense and floral transition. *Plant Physiology* **163**, 611-624.
- Choi WG, Toyota M, Kim SH, Hilleary R, Gilroy S** (2014). Salt stress-induced Ca<sup>2+</sup> waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 6497-6502.
- Christensen SK, Dagenais N, Chory J, Weigel D** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**, 469-478.
- Christopher DA, Borsics T, Yuen CYL, Ullmer W, ndeme-Ondzighi C, Andres MA, Kang BH, Staehelin LA** (2007). The cyclic nucleotide gated cation channel AtCNGC10 traffics from the ER via golgi vesicles to the plasma membrane of Arabidopsis root and leaf cells. *BMC Plant Biology* **7**.
- Claros MG, von Heijne G** (1994). TopPred II : an improved software for membrane-protein structure predictions. *Computer Applications in the Biosciences* **10**, 685-686.
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP, Schroeder JI** (1998). The plant cDNA *LCT1* mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12043-12048.
- Clough SJ, Bent AF** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Colinet AS, Sengottaiyan P, Deschamps A, Colsoul ML, Thines L, Demaegd D, Duchene MC, Foulquier F, Hols P, Morsomme P** (2016). Yeast Gdt1 is a golgi-localized calcium transporter required for stress-induced calcium signaling and protein glycosylation. *Nature Scientific Reports* **6**, 24282.
- Colombo MI, Beron W, Stahl PD** (1997). Calmodulin regulates endosome fusion. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 7707-7712.
- Conibear E, Cleck JN, Stevens TH** (2003). Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late golgi t-SNARE Tlg1p. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 1610-1623.
- Conibear E, Stevens TH** (2000). Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late golgi. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 305-323.
- Davenport R** (2002). Glutamate receptors in plants. *Annals of Botany* **90**, 549-557.
- Davletov B, Connell E, Darios F** (2007). Regulation of SNARE fusion machinery by fatty acids. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 1597-1608.

- De Boer AH, Wegner LH** (1997). Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. *Journal of Experimental Botany* **48**, 441-449.
- DeFalco TA, Moeder W, Yoshioka K** (2016). Opening the gates: insights into cyclic nucleotide-gated channel-mediated signaling. *Trends in Plant Science* **21**, 903-906.
- de Groot PWJ, Ruiz C, de Aldana CRV, Duenas E, Cid VJ, Del Rey F, Rodriguez-Pena JM, Perez P, Andel A, Caubin J, Arroyo J, Garcia JC, Gil C, Molina M, Garcia LJ, Nombela C, Klis FM** (2001). A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative and Functional Genomics* **2**, 124-142.
- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu GH, Schroeder JI** (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science* **19**, 371-379.
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J** (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**, 532-541.
- Delhaize E, Gruber BD, Pittman JK, White RG, Leung H, Miao YS, Jiang LW, Ryan PR, Richardson AE** (2007). A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance. *Plant Journal* **51**, 198-210.
- Demaegd D, Colinet AS, Deschamps A, Morsomme P** (2014). Molecular evolution of a novel family of putative calcium transporters. *PLOS ONE* **9**, e100851.
- Demaegd D, Foulquier F, Colinet AS, Gremillon L, Legrand D, Mariot P, Peiter E, Van Schaftingen E, Matthijs G, Morsomme P** (2013). Newly characterized golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 6859-6864.
- Demidchik V, Maathuis FJM** (2007). Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist* **175**, 387-404.
- Denis V, Cyert MS** (2002). Internal Ca<sup>2+</sup> release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *Journal of Cell Biology* **156**, 29-34.
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K** (2006). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 715-730.
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Dhonukshe P, Huang F, Galvan-Ampudia CS, Mahonen AP, Kleine-Vehn J, Xu JA, Quint A, Prasad K, Friml J, Scheres B, Offringa R** (2010). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development* **137**, 3245-3255.
- Diatloff E, Forde BG, Roberts SK** (2006). Expression and transport characterisation of the wheat low-affinity cation transporter (LCT1) in the methylotrophic yeast

- Pichia pastoris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344**, 807-813.
- Dinter A, Berger EG** (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochemistry and Cell Biology* **109**, 571-590.
- Docampo R, de SW, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN** (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 251-261.
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D** (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61 **61**, 593-620.
- Dolan L** (2013). Pointing PINs in the right directions: a potassium transporter is required for the polar localization of auxin efflux carriers. *New Phytologist* **197**, 1027-1028.
- Drakakaki G, van de Ven W, Pan SQ, Miao YS, Wang JQ, Keinath NF, Weatherly B, Jiang LW, Schumacher K, Hicks G, Raikhel N** (2012). Isolation and proteomic analysis of the SYP61 compartment reveal its role in exocytic trafficking in Arabidopsis. *Cell Research* **22**, 413-424.
- Dudley AM, Janse DM, Tanay A, Shamir R, Church GM** (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Molecular Systems Biology* **1**.
- Dumetz AC, Chockla AM, Kaler EW, Lenhoff AM** (2008). Effects of pH on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1784**, 600-610.
- Dürr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee SK, Catty P, Wolf DH, Rudolph HK** (1998). The medial-golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1149-1162.
- Eible R** (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**, 18-20.
- Engelman DM, Steitz TA, Goldman A** (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino-acid-sequences of membrane-proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **15**, 321-353.
- Epstein E** (1966). Dual pattern of ion absorption by plant cells and by pelants. *Nature* **212**, 1324-1327.
- Evans MJ, Choi WG, Gilroy S, Morris RJ** (2016). A ROS-assisted calcium wave dependent on the AtRBOHD NADPH oxidase and TPC1 cation channel propagates the systemic response to salt stress. *Plant Physiology* **171**, 1771-1784.
- F.A.O.** (2016). Salt-affected soils. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/en/>.
- Fairman C, Zhou XL, Kung C** (1999). Potassium uptake through the TOK1  $K^+$  channel in the budding yeast. *Journal of Membrane Biology* **168**, 149-157.

- Fell GL, Munson AM, Croston MA, Rosenwald AG** (2011). Identification of yeast genes involved in K<sup>+</sup> homeostasis: loss of membrane traffic genes affects K<sup>+</sup> uptake. *G3-Genes Genomes Genetics* **1**, 43-56.
- Feraru E, Friml J** (2008). PIN polar targeting. *Plant Physiology* **147**, 1553-1559.
- Forestan C, Farinati S, Varotto S** (2012). The maize *PIN* gene family of auxin transporters. *Frontiers in Plant Science* **3**.
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**, 147-153.
- Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K** (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* **415**, 806-809.
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PBF, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJJ, Palme K, Offringa R** (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**, 862-865.
- Fujiwara T, Kawachi M, Sato Y, Mori H, Kutsuna N, Hasezawa S, Maeshima M** (2015). A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the golgi in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **282**, 1965-1979.
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR** (1988). *TRK1* encodes a plasma-membrane protein required for high-affinity potassium-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 2848-2859.
- Gälweiler L, Guan CH, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Gao QF, Gu LL, Wang HQ, Fei CF, Fang X, Hussain J, Sun SJ, Dong JY, Liu HT, Wang YF** (2016). Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca<sup>2+</sup> channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 3096-3101.
- Garcia-Moreno B** (2009). Adaptations of proteins to cellular and subcellular pH. *Journal of Biology* **8**, 98.
- Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, Bouchez D, Bruneau D, Boucherez J, Michaux-Ferriere N, Thibaud JB, Sentenac H** (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-655.
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jurgens G, Palme K** (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* **413**, 425-428.
- Geldner N, Richter S, Vieten A, Marquardt S, Torres-Ruiz RA, Mayer U, Jurgens G** (2004). Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis. *Development* **131**, 389-400.

- Gendre D, Oh J, Boutte Y, Best JG, Samuels L, Nilsson R, Uemura T, Marchant A, Bennett MJ, Grebe M, Bhalerao RP** (2011). Conserved Arabidopsis ECHIDNA protein mediates trans-golgi-network trafficking and cell elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 8048-8053.
- Geng Y, Wu R, Wee CW, Xie F, Wei X, Chan PMY, Tham C, Duan L, Dinneny JR** (2013). A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 2132-2154.
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE** (2005). Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 449-461.
- Gilroy S, Suzuki N, Miller G, Choi WG, Toyota M, Devireddy AR, Mittler R** (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* **19**, 623-630.
- Gleave AP** (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organizational-structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* **20**, 1203-1207.
- Goldsmith MHM** (1977). Polar transport of auxin. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **28**, 439-478.
- Golldack D, Luking I, Yang O** (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports* **30**, 1383-1391.
- Grabov A, Ashley MK, Rigas S, Hatzopoulos P, Dolan L, Vicente-Agullo F** (2005). Morphometric analysis of root shape. *New Phytologist* **165**, 641-651.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M** (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271-276.
- Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, Opekarova M, Tanner W** (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *Journal of Cell Biology* **183**, 1075-1088.
- Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W** (2006). Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **5**, 945-953.
- Grunewald W, Friml J** (2010). The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO Journal* **29**, 2700-2714.
- Guo JZ, Wei J, Xu J, Sun MX** (2014). Inducible knock-down of GNOM during root formation reveals tissue-specific response to auxin transport and its modulation of local auxin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1165-1179.
- Hall D, Evans AR, Newbury HJ, Pritchard J** (2006). Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1201-1210.
- Hardwick KG, Pelham HRB** (1992). *SED5* encodes a 39-kd integral membrane-protein required for vesicular transport between the ER and the golgi-complex. *Journal of Cell Biology* **119**, 513-521.

## Literaturverzeichnis

---

- Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR** (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: bust n' grab. *BMC Biotechnology* **4**.
- Haro R, Fraile-Escanciano A, Gonzalez-Melendi P, Rodriguez-Navarro A** (2013). The potassium transporters HAK2 and HAK3 localize to endomembranes in *Physcomitrella patens*. HAK2 is required in some stress conditions. *Plant and Cell Physiology* **54**, 1441-1454.
- Haro R, Garciadeblas B, Rodrigueznavarro A** (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium-transport. *FEBS Letters* **291**, 189-191.
- Hazak O, Bloch D, Poraty L, Sternberg H, Zhang J, Friml J, Yalovsky S** (2010). A Rho scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLoS Biology* **8**.
- Hepler PK** (2016). The cytoskeleton and its regulation by calcium and protons. *Plant Physiology* **170**, 3-22.
- Holroyd C, Kistner U, Annaert W, Jahn R** (1999). Fusion of endosomes involved in synaptic vesicle recycling. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 3035-3044.
- Holthuis JCM, Nichols BJ, Dhruvakumar S, Pelham HRB** (1998a). Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *EMBO Journal* **17**, 113-126.
- Holthuis JCM, Nichols BJ, Pelham HRB** (1998b). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 3383-3397.
- Holweg CL** (2007). Acto-myosin motorises the flow of auxin. *Plant Signaling & Behaviour* **2**, 247-248.
- Horie T, Costa A, Kim TH, Han MJ, Horie R, Leung HY, Miyao A, Hirochika H, An G, Schroeder JI** (2007). Rice OsHKT2;1 transporter mediates large Na<sup>+</sup> influx component into K<sup>+</sup>-starved roots for growth. *EMBO Journal* **26**, 3003-3014.
- Horie T, Hauser F, Schroeder JI** (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science* **14**, 660-668.
- Hou GC, Kramer VL, Wang YS, Chen RJ, Perbal G, Gilroy S, Blancaflor EB** (2004). The promotion of gravitropism in Arabidopsis roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalinization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *Plant Journal* **39**, 113-125.
- Hou GC, Mohamalawari DR, Blancaflor EB** (2003). Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiology* **131**, 1360-1373.
- Huala E, Dickerman A, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang J, Huang W, Mueller L, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral B, Beavis BSC, and Rhee SY** (2001). The Arabidopsis information resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Research* **29**, 102-105.

- Huang F, Zago MK, Abas L, van Marion A, Galvan-Ampudia CS, Offringa R** (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* **22**, 1129-1142.
- Huang JB, Liu HL, Chen M, Li XJ, Wang MY, Yang YL, Wang CL, Huang JQ, Liu GL, Liu YT, Xu J, Cheung AY, Tao LZ** (2014). ROP3 GTPase contributes to polar auxin transport and auxin responses and is important for embryogenesis and seedling growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**, 3501-3518.
- Huss M, Ingenhorst G, König S, Gassel M, Droese S, Zeeck A, Altendorf K, Wiczorek H** (2002). Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V(o) subunit c. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 40544-40548.
- Iida H, Nakamura H, Ono T, Okumura MS, Anraku Y** (1994). *MID1*, a novel *Saccharomyces Cerevisiae* gene encoding a plasma-membrane protein, is required for Ca<sup>2+</sup> influx and mating. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 8259-8271.
- Ischebeck T, Werner S, Krishnamoorthy P, Lerche J, Meijon M, Stenzel I, Lofke C, Wiessner T, Im YJ, Perera IY, Iven T, Feussner I, Busch W, Boss WF, Teichmann T, Hause B, Persson S, Heilmann I** (2013). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 4894-4911.
- Jensen RB, Lykke-Andersen K, Frandsen GI, Nielsen HB, Haseloff J, Jespersen HM, Mundy J, Skriver K** (2000). Promiscuous and specific phospholipid binding by domains in ZAC, a membrane-associated Arabidopsis protein with an ARF GAP zinc finger and a C2 domain. *Plant Molecular Biology* **44**, 799-814.
- Kamal A, Goldstein LS** (2000). Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 503-508.
- Kaplan B, Sherman T, Fromm H** (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Letters* **581**, 2237-2246.
- Kepinski S, Leyser O** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451.
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SAN** (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with 2 pore domains in tandem. *Nature* **376**, 690-695.
- Kim HJ, Ok SH, Bahn SC, Jang J, Oh SA, Park SK, Twell D, Ryu SB, Shin JS** (2011). Endoplasmic reticulum- and golgi-localized Phospholipase A(2) plays critical roles in Arabidopsis pollen development and germination. *Plant Cell* **23**, 94-110.
- Kim SJ, Bassham DC** (2011). TNO1 is involved in salt tolerance and vacuolar trafficking in Arabidopsis. *Plant Physiology* **156**, 514-526.
- Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, Sychrova H** (2006). The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter NHA1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **6**, 792-800.
- Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Swarup R, Bennett M, Friml J** (2006). Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **18**, 3171-3181.

- Kleine-Vehn J, Ding ZJ, Jones AR, Tasaka M, Morita MT, Friml J** (2010). Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22344-22349.
- Kleine-Vehn J, Langowski L, Wisniewska J, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J** (2008). Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Molecular Plant* **1**, 1056-1066.
- Knight H, Trewavas AJ, Knight MR** (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal* **12**, 1067-1078.
- Ko CH, Gaber RF** (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 4266-4273.
- Krauke Y, Sychrová H** (2008). Functional comparison of plasma-membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters from two pathogenic *Candida* species. *BMC Microbiology*. **8**, 80.
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalova E** (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* **10**.
- Kushwaha R, Singh A, Chattopadhyay S** (2008). Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* **20**, 1747-1759.
- Lam SK, Siu CL, Hillmer S, Jang S, An GH, Robinson DG, Jiang LW** (2007). Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **19**, 296-319.
- Laohavisit A, Davies JM** (2011). Annexins. *New Phytologist* **189**, 40-53.
- Laohavisit A, Richards SL, Shabala L, Chen C, Colaco RDDR, Swarbreck SM, Shaw E, Dark A, Shabala S, Shang ZL, Davies JM** (2013). Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in *Arabidopsis* require the calcium regulatory protein Annexin1. *Plant Physiology* **163**, 253-262.
- Lee HY, Bahn SC, Kang YM, Lee KH, Kim HJ, Noh EK, Palta JP, Shin JS, Ryu SB** (2003). Secretory low molecular weight phospholipase A(2) plays important roles in cell elongation and shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1990-2002.
- Lee HY, Bahn SC, Shin JS, Hwang I, Back K, Doelling JH, Ryu SB** (2005). Multiple forms of secretory phospholipase A(2) in plants. *Progress in Lipid Research* **44**, 52-67.
- Lee OR, Kim SJ, Kim HJ, Hong JK, Ryu SB, Lee SH, Ganguly A, Cho HT** (2010). Phospholipase A(2) is required for PIN-FORMED protein trafficking to the plasma membrane in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **22**, 1812-1825.
- Lewis MJ, Pelham HR** (2002). A new yeast endosomal SNARE related to mammalian syntaxin 8. *Traffic* **3**, 922-929.
- Li B, Warner JR** (1996). Mutation of the Rab6 homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, YPT6, inhibits both early golgi function and ribosome biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 16813-16819.

- Li G, Xue HW** (2007). Arabidopsis PLD zeta 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. *Plant Cell* **19**, 281-295.
- Li M, Hong Y, Wang X** (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1791**, 927-935.
- Li P, Zhao CZ, Zhang YQ, Wang XM, Wang XY, Wang JF, Wang F, Bi YR** (2016). Calcium alleviates cadmium-induced inhibition on root growth by maintaining auxin homeostasis in Arabidopsis seedlings. *Protoplasma* **253**, 185-200.
- Li XY, Chanroj S, Wu ZY, Romanowsky SM, Harper JF, Sze H** (2008). A distinct endosomal  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  pump affects root growth through the secretory process. *Plant Physiology* **147**, 1675-1689.
- Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA** (1997). A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 42-47.
- Li ZY, Xu ZS, Chen Y, He GY, Yang GX, Chen M, Li LC, Ma YZ** (2013). A novel role for Arabidopsis CBL1 in affecting plant responses to glucose and gibberellin during germination and seedling development. *PLOS ONE* **8**.
- Liang F, Sze H** (1998). A high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  pump, ECA1, from the endoplasmic reticulum is inhibited by cyclopiazonic acid but not by thapsigargin. *Plant Physiology* **118**, 817-825.
- Littleton JT, Bellen HJ** (1995). Synaptotagmin controls and modulates synaptic-vesicle fusion in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. *Trends in Neuroscience* **18**, 177-183.
- Liu JP, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK** (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 3730-3734.
- Liu JP, Zhu JK** (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* **280**, 1943-1945.
- Lobstein E, Guyon A, Ferault M, Twell D, Pelletier G, Bonhomme S** (2004). The putative Arabidopsis homolog of yeast Vps52p is required for pollen tube elongation, localizes to golgi, and might be involved in vesicle trafficking. *Plant Physiology* **135**, 1480-1490.
- Logg K, Warringer J, Hashemi SH, Kall M, Blomberg A** (2008). The sodium pump Ena1p provides mechanistic insight into the salt sensitivity of vacuolar protein sorting mutants. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1783**, 974-984.
- Luo Y, Scholl S, Doering A, Zhang Y, Irani NG, Di Rubbo S, Neumetzler L, Krishnamoorthy P, Van Houtte I, Mylle E, Bischoff V, Vernhettes S, Winne J, Friml J, Stierhof YD, Schumacher K, Persson S, Russinova E** (2015). V-ATPase activity in the TGN/EE is required for exocytosis and recycling in Arabidopsis. *Nature Plants* **1**.
- Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR** (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **12**, 2175-2187.

- Maathuis FJM** (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 250-258.
- Maathuis FJM, Ahmad I, Patishtan J** (2014). Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Madrid R, Gomez MJ, Ramos J, Rodriguez-Navarro A** (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14838-14844.
- Mano Y, Nemoto K** (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2853-2872.
- Mansfeld J, Gebauer S, Dathe K, Ulbrich-Hofmann R** (2006). Secretory phospholipase A(2) from *Arabidopsis thaliana*: insights into the three-dimensional structure and the amino acids involved in catalysis. *Biochemistry* **45**, 5687-5694.
- Manzoor H, Kelloniemi J, Chiltz A, Wendehenne D, Pugin A, Poinssot B, Garcia-Brugger A** (2013). Involvement of the glutamate receptor AtGLR3.3 in plant defense signaling and resistance to *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Journal* **76**, 466-480.
- Maranda B, Brown D, Bourgoin S, Casanova JE, Vinay P, Ausiello DA, Marshansky V** (2001). Intra-endosomal pH-sensitive recruitment of the ARF-nucleotide exchange factor ARNO and Arf6 from cytoplasm to proximal tubule endosomes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18540-18550.
- Marchant A, Kargul J, May ST, Muller P, Delbarre A, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ** (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO Journal* **18**, 2066-2073.
- Marcum JM, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR** (1978). Control of microtubule assembly-disassembly by calcium-dependent regulator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 3771-3775.
- Marešová L, Hoskova B, Urbankova E, Chaloupka R, Sychrová H** (2010). New applications of pHluorin - measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**, 317-325.
- Marešová L, Sychrová H** (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Molecular Microbiology* **55**, 588-600.
- Marešová L, Vydareny T, Sychrová H** (2012). Comparison of the influence of small GTPases Arl1 and Ypt6 on yeast cells' tolerance to various stress factors. *FEMS Yeast Research* **12**, 332-340.
- Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, de Longevialle AF, Charon C, Allot M, Rappaport F, Wollman FA, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G** (2007). Two members of the Arabidopsis CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and golgi membranes, respectively. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3385-3393.
- Martiniere A, Bassil E, Jublanc E, Alcon C, Reguera M, Sentenac H, Blumwald E, Paris N** (2013). *In vivo* intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis

- reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell* **25**, 4028-4043.
- Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T, Sato K** (2011). Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiology* **156**, 20-28.
- Matsumoto TK, Ellsmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM** (2002). An osmotically induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33075-33080.
- Mayer U, Ruiz RAT, Berleth T, Misera S, Jurgens G** (1991). Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* **353**, 402-407.
- Mc New JA, Coe JGS, Sogaard M, Zemelman BV, Wimmer C, Hong WJ, Sollner TH** (1998). Gos1p, a *Saccharomyces cerevisiae* SNARE protein involved in golgi transport. *FEBS Letters* **435**, 89-95.
- McIlvaine TC** (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry* **49**, 183-186.
- Menczel L, NagyZs F, Kiss R, Maliga P** (1981). Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theoretical and Applied Genetics* **59**, 191-195.
- Mian A, Oomen RJFJ, Isayenkov S, Sentenac H, Maathuis FJM, Very AA** (2011). Over-expression of an Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant Journal* **68**, 468-479.
- Micaroni M, Perinetti G, Berrie CP, Mironov AA** (2010). The SPCA1 Ca<sup>2+</sup> pump and intracellular membrane trafficking. *Traffic* **11**, 1315-1333.
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu LH, Obermeyer G, Feijo JA** (2011). Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* **332**, 434-437.
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, Schwab R, Weigel D, Meyerowitz EM, Luschnig C, Offringa R, Friml J** (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**, 1044-1056.
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE** (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**, 192-195.
- Miller ND, Brooks TLD, Assadi AH, Spalding EP** (2010). Detection of a gravitropism phenotype in glutamate receptor-like 3.3 mutants of *Arabidopsis thaliana* using machine vision and computation. *Genetics* **186**, 585-593.
- Mills IG, Urbe S, Clague MJ** (2001). Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *Journal of Cell Science* **114**, 1959-1965.

- Mills RF, Doherty ML, Lopez-Marques RL, Weimar T, Dupree P, Palmgren MG, Pittman JK, Williams LE** (2008). ECA3, a golgi-localized P-2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis. *Plant Physiology* **146**, 116-128.
- Mironova VV, Omelyanchuk NA, Wiebe DS, Levitsky VG** (2014). Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. *BMC Genomics* **15**.
- Miseta A, Kellermayer R, Aiello DP, Fu LW, Bedwell DM** (1999). The vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Letters* **451**, 132-136.
- Mockaitis K, Estelle M** (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**, 55-80.
- Mollenhauer HH, Morre DJ, Rowe LD** (1990). Alteration of intracellular traffic by Monensin - mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1031**, 225-246.
- Mollinedo F** (2012). Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Frontiers in Oncology* **2**, 140.
- Moriwaki T, Miyazawa Y, Fujii N, Takahashi H** (2014). GNOM regulates root hydrotropism and phototropism independently of PIN-mediated auxin transport. *Plant Science* **215**, 141-149.
- Morris DA, Robinson JS** (1998). Targeting of auxin carriers to the plasma membrane: differential effects of Brefeldin A on the traffic of auxin uptake and efflux carriers. *Planta* **205**, 606-612.
- Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrasek J, Skupa P, Chand S, Benkova E, Zazimalova E, Friml J** (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* **135**, 3345-3354.
- Mravec J, Skupa P, Bailly A, Hoyerova K, Krecek P, Bielach A, Petrasek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof YD, Dobrev PI, Schwarzerova K, Rolcik J, Seifertova D, Luschnig C, Benkova E, Zazimalova E, Geisler M, Friml J** (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136-U127.
- Muir SR, Sanders D** (1997). Inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release across nonvacuolar membranes in cauliflower. *Plant Physiology* **114**, 1511-1521.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.
- Munns R, Tester M** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651-681.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A** (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10554-10559.

- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S** (1992). Tobacco BY-2 cell-line as the HeLa-cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology-A Survey of Cell Biology* **132**, 1-30.
- Nakajima H, Hirata A, Ogawa Y, Yonehara T, Yoda K, Yamasaki M** (1991). A cytoskeleton-related gene, *uso1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **113**, 245-260.
- Nakano RT, Matsushima R, Ueda H, Tamura K, Shimada T, Li LX, Hayashi Y, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2009). Gnom-like1/Ermo1 and Sec24A/Ermo2 are required for maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, 3672-3685.
- Nalefski EA, Falke JJ** (1996). The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science* **5**, 2375-2390.
- Napier RM, Venis MA** (1995). Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytologist* **129**, 167-201.
- Naramoto S, Otegui MS, Kutsuna N, de RR, Dainobu T, Karampelias M, Fujimoto M, Feraru E, Miki D, Fukuda H, Nakano A, Friml J** (2014). Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the golgi apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**, 3062-3076.
- Nass R, Cunningham KW, Rao R** (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase - insights into mechanisms of sodium tolerance. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 26145-26152.
- Navazio L, Mariani P, Sanders D** (2001). Mobilization of Ca<sup>2+</sup> by cyclic ADP-ribose from the endoplasmic reticulum of cauliflower florets. *Plant Physiology* **125**, 2129-2138.
- Nebenführ A, Ritzenthaler C, Robinson DG** (2002). Brefeldin A: Deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiology* **130**, 1102-1108.
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A** (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Journal* **51**, 1126-1136.
- Nichols BJ, Holthuis JCM, Pelham HRB** (1998). The Sec1p homologue Vps45p binds to the syntaxin Tlg2p. *European Journal of Cell Biology* **77**, 263-268.
- Nieves-Cordones M, Rodenas R, Chavanieu A, Rivero RM, Martinez V, Gaillard I, Rubio F** (2016). Uneven HAK/KUP/KT protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **7**, 127.
- Nishimura T, Matano N, Morishima T, Kakinuma C, Hayashi K, Komano T, Kubo M, Hasebe M, Kasahara H, Kamiya Y, Koshiba T** (2012). Identification of IAA transport inhibitors including compounds affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1671-1682.
- Noda Y, Yamagishi T, Yoda K** (2007). Specific membrane recruitment of Uso1 protein, the essential endoplasmic reticulum-to-golgi tethering factor in yeast vesicular transport. *Journal of Cell Biochemistry* **101**, 686-694.

- Noh B, Murphy AS, Spalding EP** (2001). Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* **13**, 2441-2454.
- Novick P, Schekman R** (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1858-1862.
- Ordenes VR, Moreno I, Maturana D, Norambuena L, Trewavas AJ, Orellana A** (2012). *In vivo* analysis of the calcium signature in the plant golgi apparatus reveals unique dynamics. *Cell Calcium* **52**, 397-404.
- Orij R, Brul S, Smits GJ** (2011). Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* **1810**, 933-944.
- Orij R, Postmus J, Ter Beek A, Brul S, Smits GJ** (2009). *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* **155**, 268-278.
- Ottenschläger I, Wolff P, Wolverson C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K** (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2987-2991.
- Ouyang J, Shao X, Li JY** (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **24**, 327-333.
- Paciorek T, Zazimalova E, Ruthardt N, Petrasek J, Stierhof YD, Kleine-Vehn J, Morris DA, Emans N, Jurgens G, Geldner N, Friml J** (2005). Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* **435**, 1251-1256.
- Pahari S** (2012). *UNHINGED* encodes a VPS51 homologue of Arabidopsis and reveals a role for the GARP complex in leaf shape and vein patterning. *Dissertation, University of Lethbridge (Alberta, Canada)*.
- Pahari S, Cormark RD, Blackshaw MT, Liu C, Erickson JL, Schultz EA** (2014). Arabidopsis *UNHINGED* encodes a VPS51 homolog and reveals a role for the GARP complex in leaf shape and vein patterning. *Development* **141**, 1894-1905.
- Paidhungat M, Garrett S** (1997). Homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca<sup>2+</sup> uptake and exacerbates the cdc1(Ts) growth defect. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6339-6347.
- Palmer CP, Zhou XL, Lin JY, Loukin SH, Kung C, Saimi Y** (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7801-7805.
- Paponov IA, Teale WD, Trebar M, Bliou K, Palme K** (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in Plant Science* **10**, 170-177.
- Park SY, Seo SB, Lee SJ, Na JG, Kim YJ** (2001). Mutation in PMR1, a Ca<sup>2+</sup>-ATPase in golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing

- expression of *PMR2*, a Na<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 28694-28699.
- Parkinson K, Baines AE, Keller T, Gruenheit N, Bragg L, North RA, Thompson CRL** (2014). Calcium-dependent regulation of Rab activation and vesicle fusion by an intracellular P2X ion channel. *Nature Cell Biology* **16**, 87-98.
- Paroutis P, Touret N, Grinstein S** (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* **19**, 207-215.
- Pedas P, Schiller SM, Hegelund JN, Ladegard AH, Schjoerring JK, Husted S** (2014). Golgi localized barley MTP8 proteins facilitate Mn transport. *PLOS ONE* **9**, e113759.
- Peiter E** (2011). The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals. *Cell Calcium* **50**, 120-128.
- Peiter E** (2016). The ever-closer union of signals: propagating waves of calcium and ROS are inextricably linked. *Plant Physiology* **172**, 3-4.
- Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux J, Hetherington AM, Sanders D** (2005). The vacuolar Ca<sup>2+</sup>-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* **434**, 404-408.
- Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pedas P, Husted S, Maathuis FJM, Blaudez D, Chalot M, Sanders D** (2007). A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8532-8537.
- Péret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang YD, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, Yang HB, Reemmer J, Venison E, Howells C, Perez-Amador MA, Yun JG, Alonso J, Beemster GTS, Laplaze L, Murphy A, Bennett MJ, Nielsen E, Swarup R** (2012). *AUX/LAX* genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *Plant Cell* **24**, 2874-2885.
- Peters C, Mayer A** (1998). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* **396**, 575-580.
- Petrášek J, Cerna A, Schwarzerova K, Eickner M, Morris DA, Zazimalova E** (2003). Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiology* **131**, 254-263.
- Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertova D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubes M, Covanova M, Dhonukshe P, Skupa P, Benkova E, Perry L, Krecek P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zazimalova E, Friml J** (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914-918.
- Philippar K, Buchsenschutz K, Edwards D, Loffler J, Luthen H, Kranz E, Edwards KJ, Hedrich R** (2006). The auxin-induced K<sup>+</sup> channel gene *Zmk1* in maize functions in coleoptile growth and is required for embryo development. *Plant Molecular Biology* **61**, 757-768.

- Philippar K, Ivashikina N, Ache P, Christian M, Luthen H, Palme K, Hedrich R** (2004). Auxin activates *KAT1* and *KAT2*, two K<sup>+</sup>-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **37**, 815-827.
- Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R** (1998). The golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* **17**, 5298-5308.
- Platt AR, Woodhall RW, George AL** (2007). Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques* **43**, 58-62.
- Plett DC, Moller IS** (2009). Na<sup>+</sup> transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell & Environment* **33**, 612-626.
- Qi Z, Hampton CR, Shin R, Barkla BJ, White PJ, Schachtman DP** (2008). The high affinity K<sup>+</sup> transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K<sup>+</sup> concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **59**, 595-607.
- Qiu QS** (2012). V-ATPase, ScNhx1p and yeast vacuole fusion. *Journal of Genetics and Genomics* **39**, 167-171.
- Qiu QS, Fratti RA** (2010). The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Nhx1p regulates the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuole fusion. *Journal of Cell Science* **123**, 3266-3275.
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM** (2000). Functional conservation between yeast and plant endosomal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters. *FEBS Letters* **471**, 224-228.
- Quintero FJ, Garciadeblas B, Rodrigueznavarro A** (1996). The *SAL1* gene of Arabidopsis, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* **8**, 529-537.
- Ramírez J, Ramirez O, Saldana C, Coria R, Pena A** (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Journal of Bacteriology* **180**, 5860-5865.
- Ramos J, Alijo R, Haro R, Rodriguez-Navarro A** (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **176**, 249-252.
- Ramos J, Haro R, Alijo R, Rodriguez-Navarro A** (1992). Activation of the potassium uptake system during fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **174**, 2025-2027.
- Ranf S, Wunnenberg P, Lee J, Becker D, Dunkel M, Hedrich R, Scheel D, Dietrich P** (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant Journal* **53**, 287-299.
- Reguera M, Bassil E, Tajima H, Wimmer M, Chanoca A, Otegui MS, Paris N, Blumwald E** (2015). pH regulation by NHX-type antiporters is required for receptor-mediated protein trafficking to the vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**, 1200-1217.

- Rickman C, Davletov B** (2005). Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18. *Chemistry & Biology* **12**, 545-553.
- Rieger KJ, El-Alama M, Stein G, Bradshaw C, Slonimski PP, Maundrell K** (1999). Chemotyping of yeast mutants using robotics. *Yeast* **15**, 973-986.
- Riezman H** (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell* **40**, 1001-1009.
- Rigas S, Debrosses G, Haralampidis K, Vicente-Agullo F, Feldmann KA, Grabov A, Dolan L, Hatzopoulos P** (2001). *TRH1* encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. *Plant Cell* **13**, 139-151.
- Rigas S, Ditungou FA, Ljung K, Daras G, Tietz O, Palme K, Hatzopoulos P** (2013). Root gravitropism and root hair development constitute coupled developmental responses regulated by auxin homeostasis in the Arabidopsis root apex. *New Phytologist* **197**, 1130-1141.
- Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG** (2002). Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco bright yellow 2 cells expressing golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* **14**, 237-261.
- Roberts SK, Fischer M, Dixon GK, Sanders D** (1999). Divalent cation block of inward currents and low-affinity K<sup>+</sup> uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **181**, 291-297.
- Robinson DG, Albrecht S, Moriysu Y** (2004). The V-ATPase inhibitors Concanamycin A and Bafilomycin A lead to golgi swelling in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **224**, 255-260.
- Robinson DG, Jiang LW, Schumacher K** (2008). The endosomal system of plants: charting new and familiar territories. *Plant Physiology* **147**, 1482-1492.
- Robinson DG, Scheuring D, Naramoto S, Friml J** (2011). ARF1 localizes to the golgi and the trans-golgi network. *Plant Cell* **23**, 846-849.
- Rodríguez-Concepción M, Yalovsky S, Zik M, Fromm H, Gruissem W** (1999). The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. *EMBO Journal* **18**, 1996-2007.
- Roy R, Bassham DC** (2015). Gravitropism and lateral root emergence are dependent on the trans-golgi network protein TNO1. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Rubery PH, Sheldrake AR** (1974). Carrier-mediated auxin transport. *Planta* **118**, 101-121.
- Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, Levitre J, Davidow LS, Mao J, Moir DT** (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in Pmr1, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell* **58**, 133-145.
- Ryu SB, Lee HY, Doelling JH, Palta JP** (2005). Characterization of a cDNA encoding Arabidopsis secretory phospholipase A(2)-alpha, an enzyme that generates bioactive lysophospholipids and free fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1736**, 144-151.

- Sanderfoot AA, Kovaleva V, Bassham DC, Raikhel NV** (2001a). Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the golgi/prevacuolar system of the arabidopsis cell. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 3733-3743.
- Sanderfoot AA, Pilgrim M, Adam L, Raikhel NV** (2001b). Disruption of individual members of Arabidopsis syntaxin gene families indicates each has essential functions. *Plant Cell* **13**, 659-666.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**, S401-S417.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Santner AA, Watson JC** (2006). The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in Arabidopsis. *Plant Journal* **45**, 752-764.
- Schachtman DP, Kumar R, Schroeder JI, Marsh EL** (1997). Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11079-11084.
- Schapiro AL, Voigt B, Jasik J, Rosado A, Lopez-Cobollo R, Menzel D, Salinas J, Mancuso S, Valpuesta V, Baluska F, Botella MA** (2008). Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *Plant Cell* **20**, 3374-3388.
- Scherer GFE, Labusch C, Effendi Y** (2012). Phospholipases and the network of auxin signal transduction with ABP1 and TIR1 as two receptors: a comprehensive and provocative model. *Frontiers in Plant Science* **3**.
- Schönichen A, Webb BA, Jacobson MP, Barber DL** (2013). Considering protonation as a posttranslational modification regulating protein structure and function. *Annual Review of Biophysics* **42**, 289-314.
- Schumacher K** (2014). pH in the plant endomembrane system - an import and export business. *Current Opinion in Plant Biology* **22**, 71-76.
- Serrano R, Rodriguez-Navarro A** (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 399-404.
- Shanks SG, Carpp LN, Struthers MS, Mccann RK, Bryant NJ** (2012). The Sec1/Munc18 protein Vps45 regulates cellular levels of its SNARE binding partners Tlg2 and Snc2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* **7**.
- Shen CJ, Bai YH, Wang SK, Zhang SN, Wu YR, Chen M, Jiang DA, Qi YH** (2010). Expression profile of *PIN*, *AUX/LAX* and *PGP* auxin transporter gene families in *Sorghum bicolor* under phytohormone and abiotic stress. *FEBS Journal* **277**, 2954-2969.
- Shen JB, Zeng YL, Zhuang XH, Sun L, Yao XQ, Pimpl P, Jiang LW** (2013). Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Molecular Plant* **6**, 1419-1437.

- Shi HZ, Ishitani M, Kim CS, Zhu JK** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6896-6901.
- Shih HW, DePew CL, Miller ND, Monshausen GB** (2015). The cyclic nucleotide-gated channel CNGC14 regulates root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **25**, 3119-3125.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y** (1962). Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223-&.
- Shirakawa M, Ueda H, Koumoto Y, Fuji K, Nishiyama C, Kohchi T, Hara-Nishimura I, Shimada T** (2014). Continuous vascular ring (COV1) is a trans-golgi network-localized membrane protein required for golgi morphology and vacuolar protein sorting. *Plant and Cell Physiology* **55**, 764-772.
- Sievers A, Busch MB** (1992). An inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the sarcoplasmic and endoplasmic reticula inhibits transduction of the gravity stimulus in cress roots. *Planta* **188**, 619-622.
- Siniooglou S, Pelham HRB** (2001). An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late golgi membranes. *EMBO Journal* **20**, 5991-5998.
- Siniooglou S, Pelham HRB** (2002). Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 48318-48324.
- Skorzynska-Polit E, Tukendorf A, Selstam E, Baszynski T** (1998). Calcium modifies Cd effect on runner bean plants. *Environmental and Experimental Botany* **40**, 275-286.
- Stanford Yeast Deletion Project** (2000). Saccharomyces Genome Deletion Project. [http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/strain\\_homozygous\\_diploid.txt](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/strain_homozygous_diploid.txt)
- Steer MW** (1988). The role of calcium in exocytosis and endocytosis in plant-cells. *Physiologia Plantarum* **72**, 213-220.
- Stefano G, Renna L, Rossi M, Azzarello E, Pollastri S, Brandizzi F, Baluska F, Mancuso S** (2010). AGD5 is a GTPase-activating protein at the trans-golgi network. *Plant Journal* **64**, 790-799.
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Galweiler L, Palme K, Jurgens G** (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**, 316-318.
- Suzuki N** (2005). Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology* **22**, 19-25.
- Swarup K, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JDG, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I,**

- Beeckman T, Laplaze L, Bennett MJ** (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**, 946-954.
- Sze H, Liang F, Hwang I, Curran AC, Harper JF** (2000). Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 433-462.
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J** (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences* **63**, 2738-2754.
- Tanaka H, Kitakura S, Rakusova H, Uemura T, Feraru MI, De Rycke R, Robert S, Kakimoto T, Friml J** (2013). Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* **9**.
- Tanaka H, Nodzylski T, Kitakura S, Feraru MI, Sasabe M, Ishikawa T, Kleine-Vehn J, Kakimoto T, Friml J** (2014). BEX1/ARF1A1C is required for BFA-sensitive recycling of PIN auxin transporters and auxin-mediated development in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **55**, 737-749.
- Teh OK, Moore I** (2007). An ARF-GEF acting at the golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* **448**, 493-496.
- Tester M, Davenport R** (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**, 503-527.
- Thomas BJ, Rothstein R** (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619-630.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang MB, Thornton S, Brettell R** (1997). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant Journal* **11**, 1369-1376.
- Tominaga M, Kojima H, Yokota E, Nakamori R, Anson M, Shimmen T, Oiwa K** (2012). Calcium-induced mechanical change in the neck domain alters the activity of plant myosin XI. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 30711-30718.
- Tripathi V, Syed N, Laxmi A, Chattopadhyay D** (2009). Role of CIPK6 in root growth and auxin transport. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 663-665.
- Uemura T, Kim H, Saito C, Ebine K, Ueda T, Schulze-Lefert P, Nakano A** (2012a). Qa-SNAREs localized to the trans-golgi network regulate multiple transport pathways and extracellular disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1784-1789.
- Uemura T, Nakano A** (2013). Plant TGNs: dynamics and physiological functions. *Histochemistry and Cell Biology* **140**, 341-345.
- Uemura T, Ueda T, Nakano A** (2012b). The physiological role of SYP4 in the salinity and osmotic stress tolerances. *Plant Signaling & Behavior* **7**, 1118-1120.
- Uemura T, Ueda T, Ohniwa RL, Nakano A, Takeyasu K, Sato MH** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-golgi network in plant cells. *Cell Structure and Function* **29**, 49-65.

- Ueoka-Nakanishi H, Tsuchiya T, Sasaki M, Nakanishi Y, Cunningham KW, Maeshima M** (2000). Functional expression of mung bean  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter in yeast and its intracellular localization in the hypocotyl and tobacco cells. *European Journal of Biochemistry* **267**, 3090-3098.
- Ulmasov T, Liu ZB, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7**, 1611-1623.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.
- Uraguchi S, Kamiya T, Clemens S, Fujiwara T** (2014). Characterization of OsLCT1, a cadmium transporter from indica rice (*Oryza sativa*). *Physiologia Plantarum* **151**, 339-347.
- Uraguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyojuka J, Ishikawa S, Fujiwara T** (2011). Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 20959-20964.
- Urbina DC, Silva H, Meisel LA** (2006). The  $\text{Ca}^{2+}$  pump inhibitor, Thapsigargin, inhibits root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Biological Research* **39**, 289-296.
- Van BK, Vanoevelen J, Callewaert G, Parys JB, De SH, Raeymaekers L, Rizzuto R, Missiaen L, Wuytack F** (2003). The contribution of the SPCA1  $\text{Ca}^{2+}$  pump to the  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in the golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**, 430-436.
- Vanneste S, Friml J** (2013). Calcium: the missing link in auxin action. *Plants* **2**, 650-675
- Vercesi AE, Docampo R** (1996). Sodium-proton exchange stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal* **315**, 265-270.
- Vernoud V, Horton AC, Yang ZB, Nielsen E** (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 1191-1208.
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of *PIN* expression. *Development* **132**, 4521-4531.
- Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, van den Berg W, van Dongen W, Richter S, Geldner N, Takano J, Jurgens G, de Vries SC, Robinson DG, Schumacher K** (2010). Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* **22**, 1344-1357.
- von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Krebs M, Stierhof YD, Schumacher K, Ludwig U** (2007). Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-golgi network. *Plant Journal* **50**, 466-474.
- von Heijne G** (1992). Membrane-protein structure prediction - hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *Journal of Molecular Biology* **225**, 487-494.

- Wang JR, Hu H, Wang GH, Li J, Chen JY, Wu P** (2009). Expression of *PIN* genes in rice (*Oryza sativa* L.): tissue specificity and regulation by hormones. *Molecular Plant* **2**, 823-831.
- Wang LC, Tsai MC, Chang KY, Fan YS, Yeh CH, Wu SJ** (2011). Involvement of the Arabidopsis HIT1/AtVPS53 tethering protein homologue in the acclimation of the plasma membrane to heat stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3609-3620.
- Wang X** (2001). Plant phospholipases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 211-231.
- Warringer J, Ericson E, Fernandez L, Nerman O, Blomberg A** (2003). High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15724-15729.
- Wegner LH, De Boer AH** (1997). Properties of two outward-rectifying channels in root xylem parenchyma cells suggest a role in K<sup>+</sup> homeostasis and long-distance signaling. *Plant Physiology* **115**, 1707-1719.
- White PJ, Broadley MR** (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**, 487-511.
- Wilkinson S, Morris DA** (1994). Targeting of auxin carriers to the plasma-membrane - effects of Monensin on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo* L. tissue. *Planta* **193**, 194-202.
- Wojas S, Ruszczynska A, Bulska E, Wojciechowski M, Antosiewicz DM** (2007). Ca<sup>2+</sup>-dependent plant response to Pb<sup>2+</sup> is regulated by LCT1. *Environmental Pollution* **147**, 584-592.
- Woodward AW, Bartel B** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.
- Xu M, Zhu L, Shou HX, Wu P** (2005). A *PIN1* family gene, *OsPIN1*, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1674-1681.
- Xue HW, Chen X, Mei Y** (2009). Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochemical Journal* **421**, 145-156.
- Yadav J, Muend S, Zhang YQ, Rao RJ** (2007). A phenomics approach in yeast links proton and calcium pump function in the golgi. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 1480-1489.
- Yang HB, Murphy AS** (2009). Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Journal* **59**, 179-191.
- Yao HY, Xue HW** (2011). Signals and mechanisms affecting vesicular trafficking during root growth. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 571-579.
- Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R** (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 8683-8692.

- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM** (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *Plant Journal* **30**, 529-539.
- Yu DN, Danku JMC, Baxter I, Kim S, Vatamaniuk OK, Vitek O, Ouzzani M, Salt DE** (2012). High-resolution genome-wide scan of genes, gene-networks and cellular systems impacting the yeast ionome. *BMC Genomics* **13**.
- Yu QY, An LJ, Li WL** (2014). The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants. *Plant Cell Reports* **33**, 203-214.
- Yuen CCY, Christopher DA** (2013). The group IV-A cyclic nucleotide-gated channels, CNGC19 and CNGC20, localize to the vacuole membrane in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany - Plants* **5**, 1-14.
- Zažímalová E, Murphy AS, Yang HB, Hoyerova K, Hošek P** (2010). Auxin transporters - why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a001552.
- Zhang J, Nodzynski T, Pencik A, Rolcik J, Friml J** (2010). PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 918-922.
- Zhang J, Vanneste S, Brewer PB, Michniewicz M, Gronos P, Kleine-Vehn J, Lofke C, Teichmann T, Bielach A, Cannoot B, Hoyerova K, Chen X, Xue HW, Benkova E, Zazimalova E, Friml J** (2011). Inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> signaling modulates auxin transport and PIN Polarity. *Developmental Cell* **20**, 855-866.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W** (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**, 203-214.
- Zhao J, Cheng NH, Motes CM, Blancaflor EB, Moore M, Gonzales N, Padmanaban S, Sze H, Ward JM, Hirschi KD** (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K<sup>+</sup> transporter. *Plant Physiology* **148**, 796-807.
- Zhao JW, Lin W, Ma XH, Lu QY, Ma X, Bian GH, Jiang LH** (2010). The protein kinase Hal5p is the high-copy suppressor of lithium-sensitive mutations of genes involved in the sporulation and meiosis as well as the ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics* **95**, 290-298.
- Zhao YK, Wang T, Zhang WS, Li X** (2011). SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **189**, 1122-1134.
- Zhao YY, Du JC, Zhao G, Jiang LH** (2013). Activation of calcineurin is mainly responsible for the calcium sensitivity of gene deletion mutations in the genome of budding yeast. *Genomics* **101**, 49-56.
- Zhu JH, Gong ZZ, Zhang CQ, Song CP, Damsz B, Inan G, Koiwa H, Zhu JK, Hasegawa PM, Bressan RA** (2002). OSM1/SYP61: a syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* **14**, 3009-3028.

## Literaturverzeichnis

---

- Zhuang X, Xu Y, Chong K, Lan L, Xue Y, Xu Z** (2005). OsAGAP, an ARF-GAP from rice, regulates root development mediated by auxin in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment* **28**, 147-156.
- Zhuang XL, Jiang JF, Li JH, Ma QB, Xu YY, Xue YB, Xu ZH, Chong K** (2006). Over-expression of OsAGAP, an ARF-GAP, interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development. *Plant Journal* **48**, 581-591.
- Zouhar J, Rojo E, Bassham DC** (2009). AtVPS45 is a positive regulator of the SYP41/SYP61/VTI12 SNARE complex involved in trafficking of vacuolar cargo. *Plant Physiology* **149**, 1668-1678.
- Zuo JR, Niu QW, Chua NH** (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal* **24**, 265-273.

## 8. Anhang

```

AAAATCTTTATGCGTTTGTTCACAAGCAGGTGATACTCACTAAAGATAATTTGTTAAAGCGAA
GATGGGTGGGCAGTTCATGGTGTGTTTTTGTGATCATGATGAAACAATTCACATCTCTTCAT
AGATCGCCCTCTCGCAAATTACTTTGGCGCACGATTCATATAGCCTTTAACATCGTCCCGCCA
GTTAGCATTGAATCATTATTTGGGACGTGGTTAGCTGGGGTGAAAGTATTACTGCGGCTCGTA
TTCGAATTGGAATATGTGCATTTA TGTCGG CTATAAGGAACTACAGGAATAATATGATTTTTAA
CAGACA ACATATTTTAATTTTCTTGCAGGTCACTTCAGAGCTACGGCATGAATCCGTACGTGG
TCCTTACTCACTCATAACGGGCTTCAGGGAGCCACCGTTACTGGGTGCAACCAATGGGAGATGG
TAGCACC GGCTATTTCAACCGGTTTGATAACGGTCGCATAACAGGATTGAAGTCTAGGACCC
TAGTCCTTTACAGCATAACGATTATGGCATTGCGGTCTTTTTCTTTATTTTGCTTTGCTCACTT
TGCGAGCTGTAATACTTTGAAGACTTTGTATTATTTTAAAACTTTTTTAATAATATGGCTGCA
TGCATCAGTCGGATGCAGATGCCAGGGGCAAGTCTCATTTTCCAATTTTTTATTATTATCGTAG
GGAGTAATATATGTGG TGTCAT GGAATAATTTATTTATCAGGTTGTAGACTCATCTTATCTTGA
TATGTGTGATGTTACTCATAGTGTGAGTGACTTGTATATTACTCAATT TGTCTC TCTCCTCAT
TAATTAGCTGCCACATCATTCTTTTTTTTGTATTG TGTCAT CTATATTCCTCTCTATGTTACT
CCCCTATGGATAGTCCCAGGGGTCAACCCAACAATGGCGGCTCCAGGAATTTGCGACCGGATA
TTCATGTGTATTCAATTTTGTAAAATCATTGTTGTTTTTTGAAAATTATCATTGTTTTGCCAAA
ACCAACACTGTTTTGTAAAAAATCATGAGTATTCATATGAAGACCTAAGAATACCCCTAACGCC
GCCCCGCAACCCGGGCCCTCTTCTGGCATCTTAGCTGGAAAATTGGCACCCCATGGGCGTCA
AGATCTTCCTTTGGCTCGCCGGTT TGGACA GGTGCTGGACTGATGCACGCCTAGCCCGCTGCA
TCCTTTGTGATCAAGCCGAGGAGTCCATGCATCACGTGCTTGCCGAATGTGTTTTCTCTCGCAT
CATTGGCA CAGACA CAGTACATTGA TGTCGG CTCACCATCACACCACCGAATGAGAC TGTCAG
CTTCCTGAATAGTGGTCATCGGGTGTTCATAACTCTACGCCCTTGCTAGCACAAAGGGATTGGT
ACGCTTATTGCCCTAATTGCTTGGGTCAATGGAAGATCGCAATGCTTGCGAAGTCACGCCATC
TCATTCCCACCTGGTACACACCATCCAGGAGGATGCTCGCATCTGGGCTAAAGCGGGTGTCTGA
GGCTTTAGTAACTTGATCCCTGTAATCTAAACCCTT TGTCTC TTGGGGCTGAGCATCCGCCTTC
CCTCTCTGTTACCGGCATCCTCGCTAGCGTTTTCTAGTGTACGCCACGCGAGGACCGCCACTA
CCCTGTAATTTTTACTCTCTCTATCAATGGAGATTGCTCTCATGAGTATTCACGAAAAGGAAG
TTTGTGGCGATTTGATACAGAGAACAGCGCAAGTGAAGGTACTCGGCACTGATGGCGTTAGCGT
GTCGA ACGAGCAATAGCTGTGCGTACAACAGGAGGAGCGGCCGAGCGCCAGTTGAGTCAACGTA
AGGGGCAGCATATAATAACATAAAAAATACAAAAAATTTCCACGTCAACAAAGATATATAGTT CG
GACA AAAAAGAATCT TCCACA GTGTTACCACTACATTTATTTATGGCCGGATACTTACCACGCAG
GTAAAAAGAATACAGTAAAAGAGCTGAGAACGCC TATAAAAAGACA AGGTCCATTTCAGCG CAGAC
ATCATCCAGGAATTCATCTACGTTTCCACTCTCTTCTCCTCCTCCTCCTCGGACTGCTCAACGG
TGGTCCGTCGTCGGCGACGGCAGTTT ATGACGGCGCGCCGCTCCTCCTCCTCCTCGGACTGCTCAACGG
CTCGGTGTCCGTGGCCGGCCACGGGCAGTTT GATGACGGT CACCGGCTACCTCCTCCTCCTCC
TCCTGA
    
```

Abbildung 8.1. Sequenz der etwa 2 kBp großen 5'-aufwärtsgelegenen putativen *TaLCT1*-Promotorregion (5' - 3' -Richtung)

**TATAAA** – TATA-Box

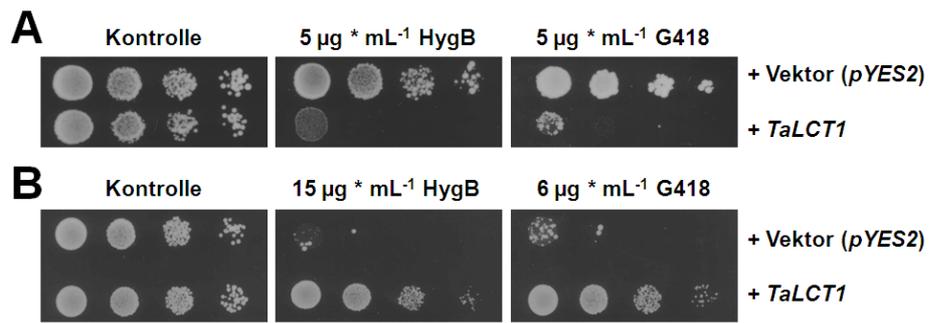
grau unterlegt - nicht-translatierte 5'-Region

**ATG** - Startcodon

*kursiv* - Beginn des *TaLCT1*-Gens

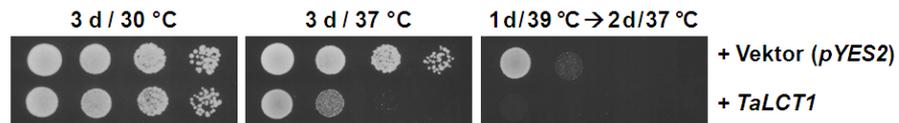
putative *Auxin Responsive Elements* (AuxREs)

**TGTCTC** / **GAGACA**  
**TGTCTN** / **TGTCTC** / **NAGACA** / **GNGACA**  
**TGTCTN** / **NNGACA**



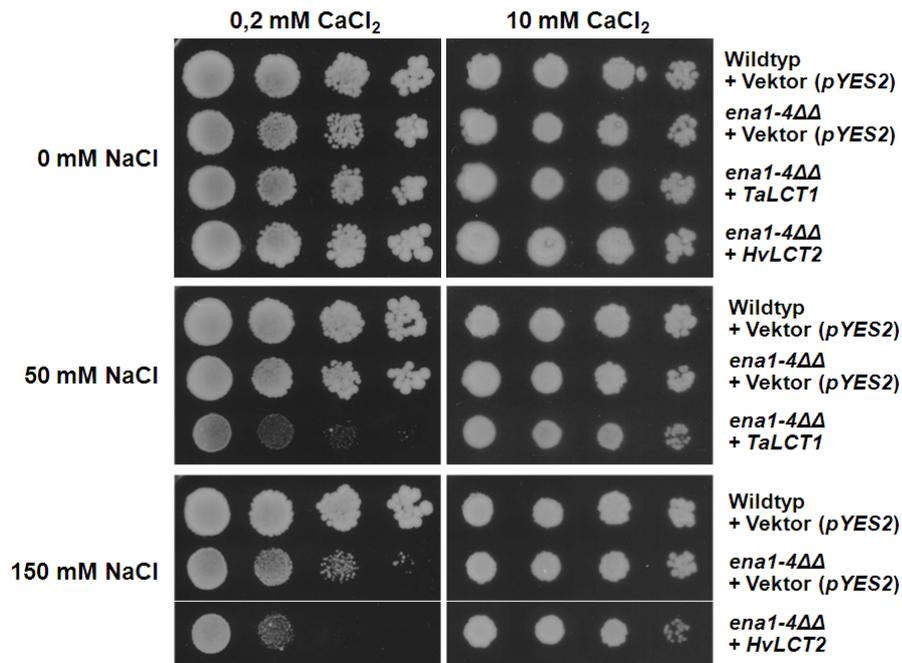
**Abbildung 8.2. Unterschiedliche *TaLCT1*-transformierte Hefestämme zeigen unterschiedliche Reaktionen auf Aminoglykosidantibiotika.**

(A) *TaLCT1*-transformierte G19-Zellen (*ena1-4Δ*) zeigen erhöhte Sensitivität gegenüber Hygromycin B und G418. (B) Im Gegensatz dazu zeigen *TaLCT1*-transformierte Wildtyp-Zellen (BY4741) erhöhte Toleranz im Vergleich zu Leervektor-transformierten Zellen.



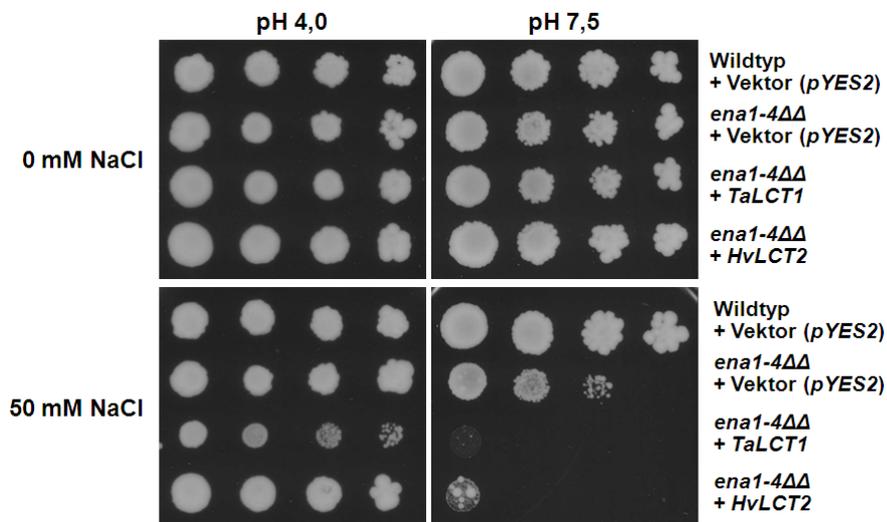
**Abbildung 8.3. *TaLCT1*-transformierte G19-Hefezellen zeigen verschlechtertes Wachstum bei erhöhten Inkubationstemperaturen.**

## Anhang



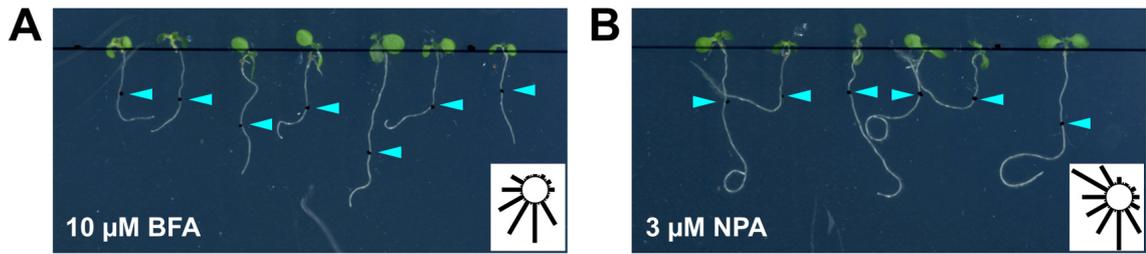
**Abbildung 8.4. Moderate extrazelluläre Calciumkonzentrationen senken die Natriumsensitivität von G19-Hefezellen.**

Sowohl *TaLCT1*- als auch *HvLCT2*-transformierte G19-Zellen zeigen schlechteres Wachstum bei erhöhten NaCl-Konzentrationen (*TaLCT1*-Zellen bei 50 mM NaCl; *HvLCT2*-Zellen bei 150 mM NaCl) in Anwesenheit geringer CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,2 mM). Bei 150 mM NaCl zeigen auch die Leervektor-transformierten G19-Zellen ein schlechteres Wachstum als Wildtyp-Zellen (W303-1A). Die erhöhte NaCl-Sensitivität der Zellen wird bei Anwesenheit von 10 mM CaCl<sub>2</sub> deutlich abgeschwächt. (Wachstumsbedingungen: 6 Tage bei 30°C; pH-Wert des AP-Mediums: 6,5).



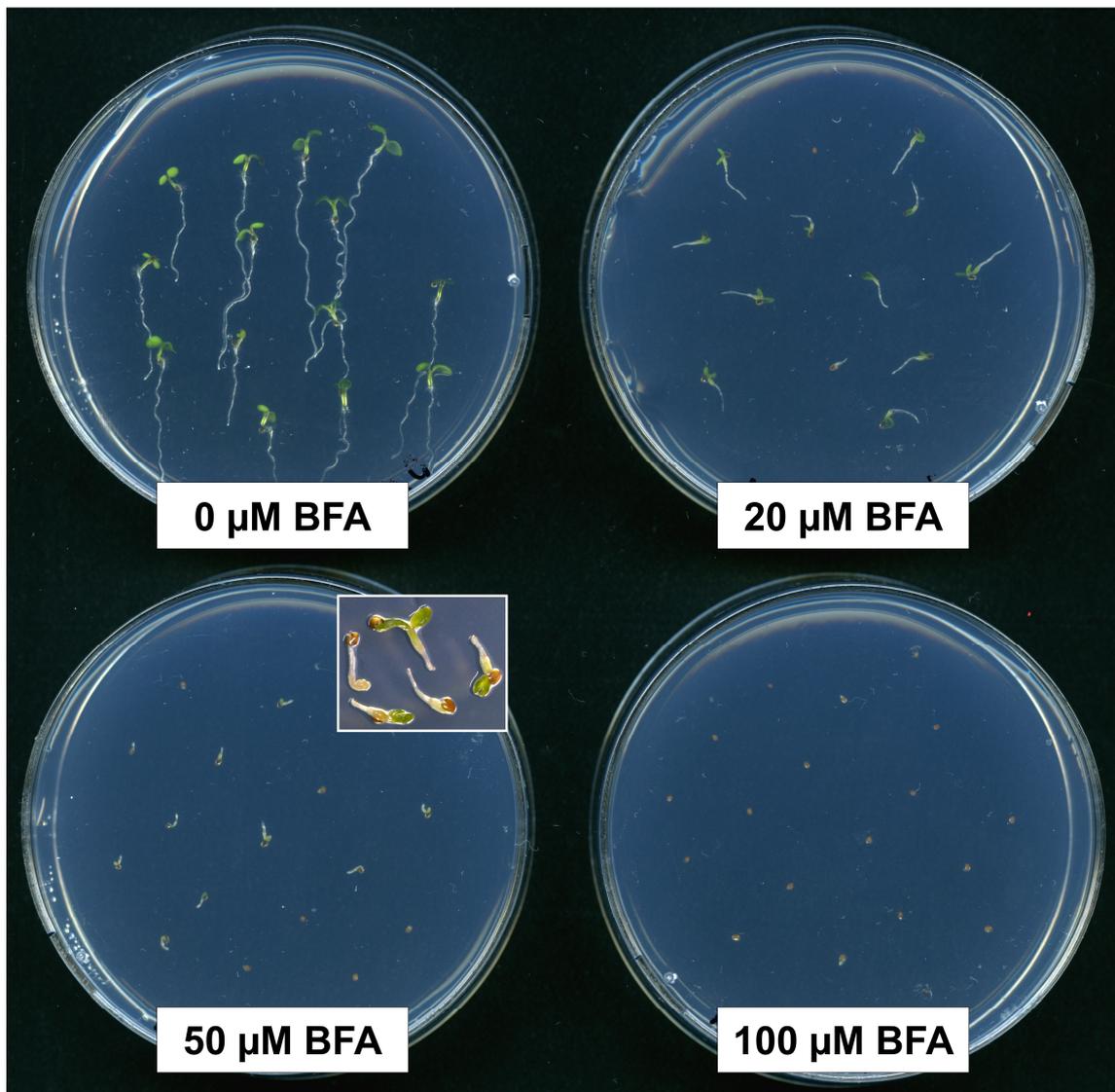
**Abbildung 8.5. Die Absenkung des pH-Werts des Mediums schwächt die Natriumsensitivität von Hefezellen.**

Bei Erhöhung des pH-Werts von 6,5 (siehe Abb. 8.4) auf 7,5 zeigen *TaLCT1*-, *HvLCT2*- aber auch Leervektor-transformierte G19-Zellen eine verstärkte Sensitivität gegenüber NaCl. Eine Absenkung des pH-Werts auf 4,0 bewirkt dagegen eine deutliche Verringerung der NaCl-Sensitivität. (Wachstumsbedingungen: 6 Tage bei 30°C; CaCl<sub>2</sub>-Konzentration im AP-Medium: 0,2 mM)



**Abbildung 8.6. Der Effekt von Brefeldin A (BFA) und *N*-1-Naphthylphthalamidsäure (NPA) auf den Wurzelgravitropismus von *Arabidopsis*-Pflanzen.**

5 Tage alte, auf ½ MS-Agar gewachsene Pflanzen wurden für 4 weitere Tage auf ½ MS-Medien mit 10 µM BFA oder 3 µM NPA transferiert. Blaue Pfeilspitzen markieren die Wurzellänge zum Zeitpunkt des Transfers. Die Richtungsdiagramme zeigen deutliche Störungen des gravitropischen Wurzelwachstums an.



**Abbildung 8.7. Der Effekt von unterschiedlichen BFA-Konzentrationen auf die Keimung und frühe Keimlingsentwicklung von *Arabidopsis*-Pflanzen.**

Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt Pflanzen, die auf Medium mit 50 µM BFA keimten. Diese zeigen ähnliche morphologische Wachstumsdefekte wie *TaLCT1*-exprimierende Keimlinge. Keimung und Wachstum erfolgten für 6 Tage bei vertikaler Ausrichtung der Agarplatten.

## 8.1. Work flow for performing an analysis of root gravitropism

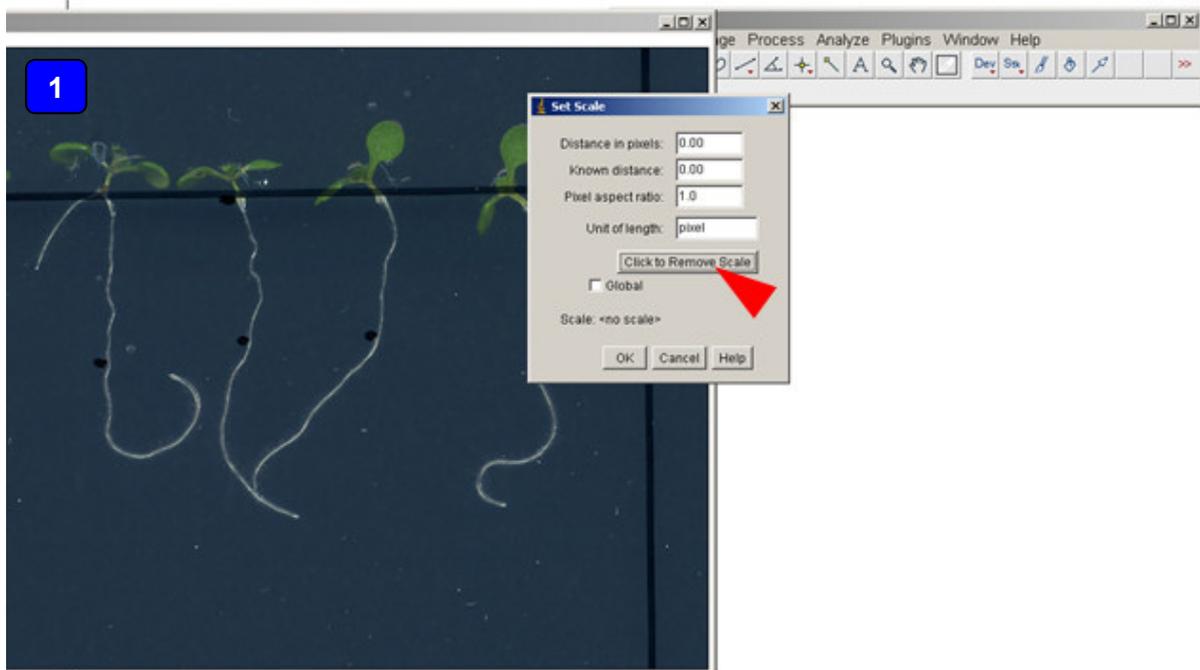
Note that although this workflow is presented by means of *Arabidopsis thaliana* roots, the whole procedure can be easily applied to shoots either.

### 8.1.1. Step 1. Digitizing plants.

Usually root growth experiments are performed on agar plates that were oriented vertically. The plants on these plates can be easily digitized by putting the plates on a commonly used document scanner. In general a resolution of 400 to 600 dpi is appropriate to deliver good results. However, in some cases (e.g. when plants are still very young or small) it might be useful to try higher scanning resolutions, although image file size could possibly become very large.

### 8.1.2. Step 2. Determination of growth coordinates with *ImageJ*

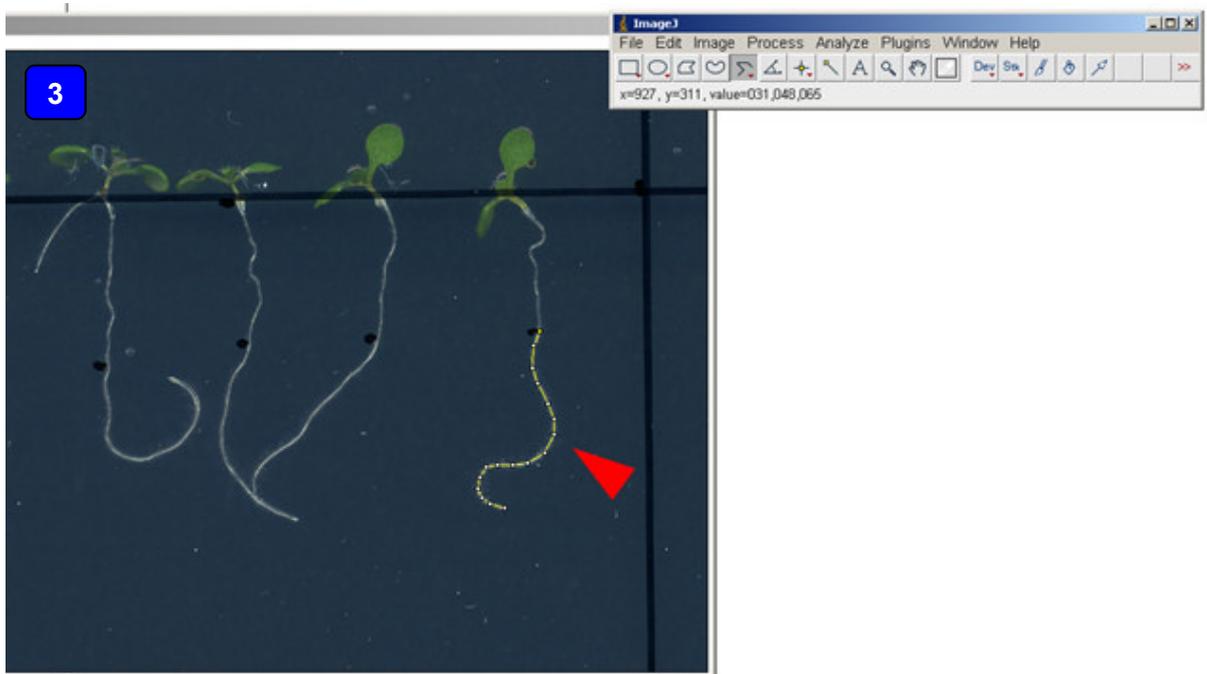
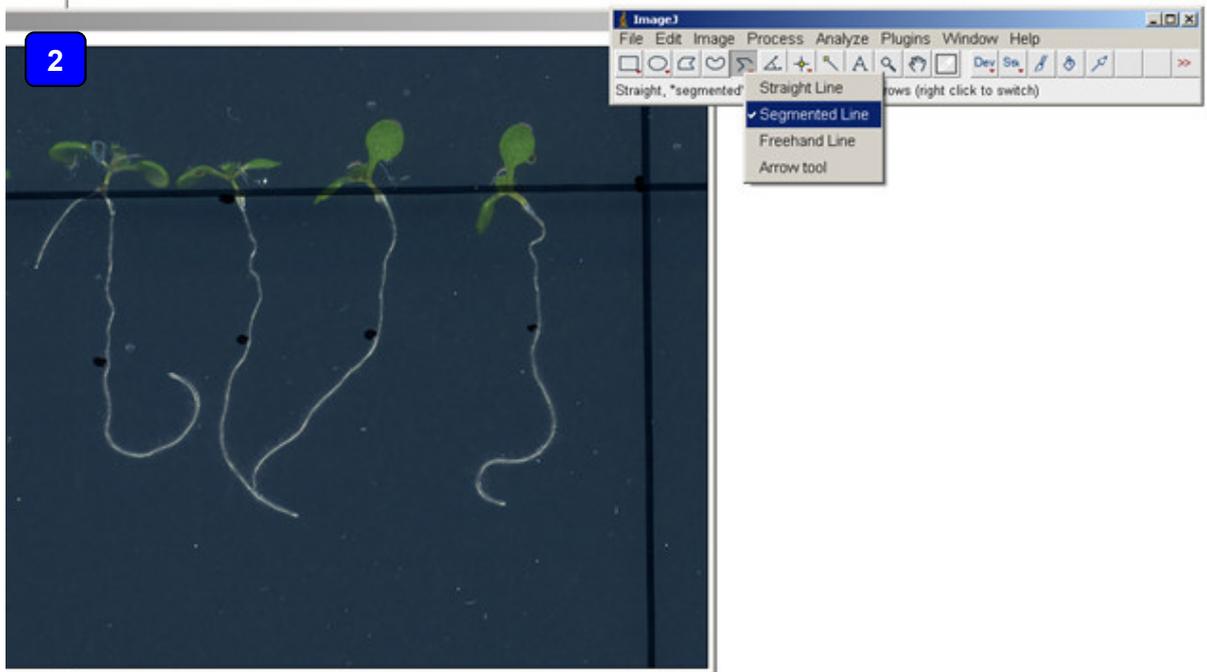
In the next step the root growth has to be converted to growth coordinates. For this reason the freely available software *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>) can be used, but other measuring software might be useful as well, if the output format is equal to *ImageJ*.



However, the images created under step 1 are opened in *ImageJ*. Due to the reason that the most detailed results are obtained when growth coordinates are presented in pixels, it is recommended to remove a possibly predefined scale (*Analyze* → *Set Scale* → *Click to remove scale*). Next you should check that the origin of the coordinate system is the upper left corner of the image, meaning that this corner has the

## Anhang

coordinates 0;0. In *ImageJ* this usually is preset but, in the case it is not, it can be changed under *Analyze* → *Set Measurements* → *Invert Y coordinates*.

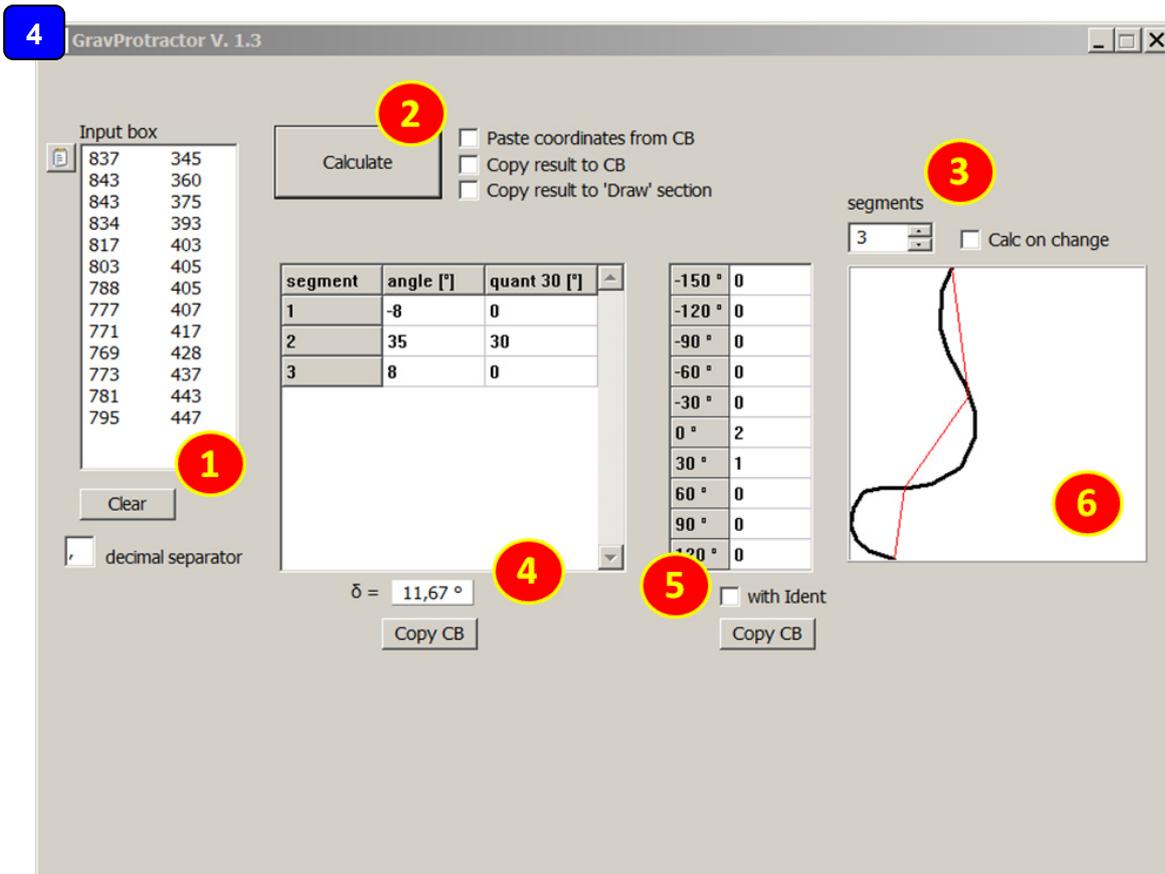


Now, chose *Segmented Line* as drawing tool and trace the root to be analysed with a polygonal line by hand. Pressing “t” on the keyboard will add the selected line to the ROI manager (region of interest manager). To export the growth coordinates mark the respective ROI in the ROI manager and select *File* → *Save as* → *XY coordinates*, which allows you to save the growth coordinates in standard Text-file format.

## 8.1.3. Step 3. Data processing in *GravProtractor*

The generated file can be opened with any standard text editor program such as *Windows Notepad*. The file contains the growth coordinates for each point of the selected polygonal line in x;y pairs separated by a tabulator. Copy the whole content of the file to the clipboard and paste it to the input box of *GravProtractor*.

### 8.1.3.1. 'Calculate' section



#### 8.1.3.1.1. – *Input box*

Paste x;y-pairs for growth coordinates separated by a tabulator into the *input box*.

Alternatively files can be opened via the -button which is located next to the *Input box*. The box can be quickly cleared by pressing the *Clear*-button. In the case decimal numbers are used in the input box you can also change the type of decimal separator (e.g. comma or point).

#### 8.1.3.1.2. – *Calculate-button*

Starts the processing of the input data according to the settings.

*Paste coordinates from CB* : If this option next to the *Calculate*-button is checked coordinate data currently stored in the clipboard are directly pasted to the *Input-Box*

when the *Calculate*-button is pressed. This option might save some time if many measurements are performed.

!!! Make sure that proper coordinate data are stored in the clipboard when using this option. Otherwise the program might crash.

*Copy result to CB* : If this option is checked the result from the calculation is directly stored in the clipboard when the *Calculation*-button is pressed. This option might save some time if many measurements are performed.

!!! This option overrides any currently stored data in the clipboard.

*Copy result to 'Draw' section* : If this option is checked the result from the calculation is directly send to the *'Draw'* section. Here the former data are replaced and a new gravitropism diagram is drawn.

### **8.1.3.1.3. – Segments**

Defines the number of equal segments in which the root is supposed to be divided. After changing this value you have to hit the *Calculate*-button to make the changes visible. If the *Calc on change* option is checked the calculation is always immediately executed upon changing the segment number. (! Checking this option also overrides the *Paste coordinates from CB* option.) The range of valid values for the segments is 1 to 65000. Preset is 100.

### **8.1.3.1.4. – Result Output: Individual Angles**

This result box contains for each individual segment the calculated growth angle and the quantized growth angle (in steps of 30°). Below the box you find the result for the mean angle  $\bar{\delta}$  which represents the mean value from the individual growth angles.

The *Copy CB* button can be used to quickly store the angles to the clipboard. These data then can be used for further processing in e.g. *Microsoft Excel* (see paper).

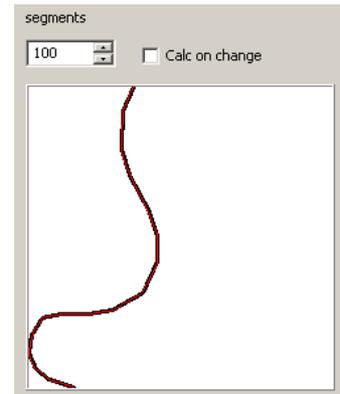
### **8.1.3.1.5. – Result Output: Angle categories**

This box contains the summed and sorted quantized angles based on the data from box 4. These data can be used for either drawing an individual gravitropism diagram in the *'Draw'* section or for calculating mean values in e.g. *Microsoft Excel*. If the latter one is intended the *Copy CB* button below the box quickly stores the values in the clipboard. If the *with Ident* option is checked the data are copied together with the respective angle identifier.

## 8.1.3.1.6. – Result Output: Graphical output

This small box shows in black a line drawing of the root to be analysed according to the given growth coordinates. Red colored lines visualize the vectors which are formed by consecutive points on the root path according to the defined number of segments (see above). Vectors for increased numbers of segments usually better match the given root path (compare the right figure for 100 segments with the figure above for three segments).

! The program automatically adjusts the size of the drawing to the box so that the drawing might appear smaller or bigger than the original.



## 8.1.3.2. 'Draw' section

5 GravProtractor V. 1.3

Calculate Draw

Input table

	Value	± Error
-150 °	23	23
-120 °	20	20
-90 °	17	17
-60 °	72	39
-30 °	93	50
0 °	225	41
30 °	288	73
60 °	125	53
90 °	35	26
120 °	43	30
150 °	52	28
180 °	7	

Clear  activate error

Pen: 3

Circle: 69

Draw

Copy CB

### 8.1.3.2.1. – Input table.

Here the results for sorted and summed angles obtained from the 'Calculate' section can be inserted. This can be achieved by either sending the data directly from the 'Calculate' section (see above), by entering values in the individual cells of the table or

by pasting appropriate data that are currently stored in the clipboard. This is done by left-clicking on the 'Value' header of the table.

The table can be quickly cleared by clicking the *Clear*-button.

The option *activate error* is needed if creation of gravitropism diagrams for plotting mean values with error bars is requested. This opens the additional  $\pm$ *Error*-column in the table where values for error bars can be inserted also by direct input or by clicking on the column header to paste data from the clipboard.

Note: Values for error bars have to be calculated separately (e.g. in Microsoft Excel). Also the values must be positive integers.

### **8.1.3.2.2. – Draw-button.**

The *Draw*-button provokes drawing of the gravitropism diagram according to the current data in the input table.

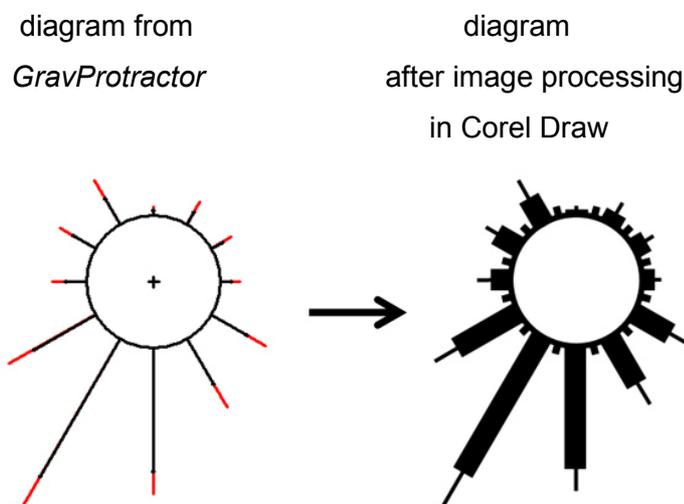
### **8.1.3.2.3. – Pen thickness & Circle size**

As the name indicates values for pen thickness and the radius of the diagram circle can be changed here. If the radius of the circle is changed the relative length of the emitted rays is automatically adjusted.

### **8.1.3.2.4. – Result output: Graphical output**

After clicking the *Draw*-button the gravitropism diagram is plotted in this box. It consists of a circle in the middle of the diagram and emitted rays that represent the relative values of the individual growth directions, meaning that the higher values correspond with the longer rays and with this the favoured growth directions. If the *activate error* option is checked the data from the 'Value' column are drawn in black, the respective error bars in red lines according to the values in the 'Error' column.

The resulting diagram can be exported by clicking the *Copy CB* button which stores the image as bitmap in the clipboard. By this way it can be easily exported to programs such as *Microsoft Paint* or *Corel Draw* for further image processing.



## 9. Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$	cytosolische Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
½ MS	halbstarkes Murashige und Skoog Medium
∞	unendlich
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BFA	Brefeldin A
Bp, kBp, kB	Basenpaare, Kilobasenpaare, Kilobasen
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CE U	Cohesive End Units
ConcA	Concanamycin A
C-terminal	carboxy terminal
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DIC	Nomarski Differentialinterferenzkontrast
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	early endosome
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetat
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
g	Gravitationsfeldstärke
g, kg, mg, µg, ng, pg	Gramm, Kilo-, Milli-, Mikro-, Nano-, Piko-
G418	Geneticin
GFP	green fluorescent protein
GUS	β-Glucuronidase
h, min, sek	Stunden, Minuten, Sekunden
H <sub>2</sub> O <sub>dem</sub>	demineralisiertes Wasser
HygB	Hygromycin B
k.o.	knock out

## Abkürzungsverzeichnis

---

Kpt.	Kapitel
L, mL, $\mu$ L	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, $\mu$ M, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mqH <sub>2</sub> O	Milli-Q Wasser; Millipore gereinigtes Wasser
mRNA	messenger RNA
N-terminal	amino terminal
pH <sub>cyt</sub>	cytosolischer pH-Wert
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
T-DNA	Transfer-DNA
TGN	<i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk
U	units
u.a.	unter anderem
UPM	Umdrehungen pro Minute
V&MT	Vesikel- und Membrantransport
VGI	vertical growth index
XFP	unbestimmtes fluoreszierendes Protein (GFP, YFP ...)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 10. Publikationen, Konferenzbeiträge, Posterpräsentationen

### Publikationen

Zhao, Y., Yan, H., Happeck, R., Peiter-Volk, T., Xu, H., Zhang, Y., Peiter, E., van Oostende Triplet, C., Whitewaye, M., Jiang, L. (2016). The Plasma Membrane Protein Rch1 is a Negative Regulator of Cytosolic Calcium Homeostasis and Positively Regulated by the Calcium/Calcineurin Signaling Pathway in Budding Yeast. *European Journal of Cell Biology* **95**, 164-174

### Konferenzbeiträge (mündliche Präsentationen)

Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E. The Wheat Low-affinity Cation Transporter (TaLCT1) Localizes to Golgi-associated Vesicles and Alters Calcium Signaling. *International Plant Calcium Signaling Conference 2014*, Münster (Germany)

Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E. The Wheat Low-affinity Cation Transporter (TaLCT1) Localizes to Golgi-associated Vesicles and Alters Auxin Transport in *A. thaliana*. *Internationale Botanikertagung 2015*, München/ Freising (Germany)

Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E., *et al.* Defining the Role of Low-affinity Cation Transporters in Cereal Crops. *Interdisciplinary Center for Crop Plant Research (IZN), Annual Meetings 2011-2015*, Halle (Germany)

### Konferenzbeiträge (Posterpräsentationen)

**Happeck, R., Köhler, K., Freitag, L., Beschow, H., Peiter, E.** (2012). Defining the Role of Ca<sup>2+</sup>-permeable Cation Transport Proteins in Salt Tolerance of Cereal Crops. *Plant Nutrition Conference 2012*, Bonn (Germany)

**Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E.** Defining the Role of Low-affinity Cation Transporters in Cereal Crops. *Interdisciplinary Center for Crop Plant Research (IZN), Annual Meeting 2012*, Halle (Germany)

**Happeck, R., Köhler, K., Rech, J., Freitag, L., von Wirén, N., Peiter, E.** (2013). Gramineae-specific Low-affinity Cation Transporters (LCTs). A Newly Identified Gene from Barley Alters Calcium Signals and Increases the Sensitivity of Yeast to Sodium and Lithium. *International Plant Nutrition Conference 2013*, Istanbul (Turkey)

**Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E.** (2014). The Wheat Low-affinity Cation Transporter (TaLCT1) Localizes to Golgi-associated Vesicles and Alters Calcium Signals. *Plant Nutrition Conference 2014*, Halle (Germany)

**Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E.** Defining the Role of Low-affinity Cation Transporters in Cereal Crops. *Interdisciplinary Center for Crop Plant Research (IZN), Final Meeting 2015*, Halle (Germany)

### Sonstige Beiträge

**Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E.** Defining the Role of a Low-affinity Cation Transporter in Salt and Drought Tolerance of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Interdisciplinary Center for Crop Plant Research (IZN), Scientific Report 2012*, 34-39

**Happeck, R., von Wirén, N., Peiter, E.** Defining the Role of Low-affinity Cation Transporters in Cereal Crops. *Interdisciplinary Center for Crop Plant Research (IZN), Final Report 2015*

### 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

*I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.*

Halle (Saale), den

---

Datum / Date

---

Unterschrift des Antragstellers /  
*Signature of the applicant*

### 12. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben. Insbesondere gilt mein herzlicher Dank ...

... Prof. Dr. Edgar Peiter für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gute Betreuung und die gemeinsame Zeit, mit vielen spannenden Diskussionen über die Arbeit und darüber hinaus.

... Prof. Dr. Nicolaus von Wirén, der zusammen mit Prof. Dr. Edgar Peiter, im Rahmen des Interdisziplinären Zentrums für Nutzpflanzenforschung (IZN), mir die Bearbeitung des Projektes ermöglichte, welches die Grundlage für die vorliegende Dissertation war.

... Prof. Dr. Gabriel Schaaf, der sich für die externe Begutachtung der Dissertation bereit erklärte.

... den Doktoranden der Arbeitsgruppe mit denen ich eine gemeinsame Zeit teilen durfte: Bastian, Dagmar, Jan, Julia, Lisa, Mario, Nancy, Nufaid, Victoria und Xuefeng. Vielen Dank für die gegenseitige Hilfe, die spannenden Diskussionen sowie die vielen denkwürdigen Erinnerungen aus dem Labor, den gemeinsamen Ausflügen oder sonstigen Unternehmungen.

... Marion Müller, Liane Freitag, Tina Peiter-Volk, Anja Janssen, Kristin Peter und Elvira Leibrich (†) für die hervorragende technische Unterstützung im Labor und die Aufrechterhaltung der guten Laune in der Arbeitsgruppe. Auch unsere gemeinsamen Ausflüge und Weihnachtsfeiern, die maßgeblich von euch organisiert wurden, werde ich nie vergessen :)

... Dr. Heidrun Beschow und Dr. Wolfgang Gans für die vielen interessanten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche im Büro und beim allmorgendlichen Kaffeetrinken.

... Dr. Kathrin Thor und Dr. Jens Müller für die theoretische und die praktische Unterstützung rund um das Thema Mikroskopie.

... Prof. Dr. Holger B. Deising, Prof. Dr. Klaus Pillen und Prof. Dr. Ingo Heilmann sowie Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppen, die bei bestimmten Fragestellungen durch fachliche Expertise, praktische Hilfe und sonstige Ressourcen zum Fortschritt der Arbeit beitrugen.

... Prof. Dr. Marcel Quint und Dr. Carolin Delker, die mir nach Ende des Projektes für einige Zeit die Möglichkeit gaben in ihrer Laborgruppe zu arbeiten und mich damit finanziell unterstützten.

## Danksagung

---

... Prof. Dr. Linghuo Jiang (*et al.*), dessen Bekanntschaft und die damit verbundene Kenntnisnahme seiner Arbeit zu weiterführenden, richtungsweisenden Ideenansätzen im Projekt führte.

... allen Projekt-, Bachelor- und Master-Studierenden, die ich betreuen durfte und die mit helfender Hand sowie interessanten Ideen und Fragen das Projekt unterstützten und bereicherten.

... guten Freunden wie u.a. Ulli (†), Heral, Volker und Edith (†), die mich durch aufmunternde Worte und ihr stetes Interesse am Fortschritt meiner Arbeit über die Jahre begleiteten und motivierten.

... meiner Familie, die mich, trotz meines oftmals eher unkonventionellen Lebensweges, immer unterstützt hat, wo sie nur konnte.

Abschließend und ganz besonders möchte ich meiner Mutter danken, die 2015 verstarb und die somit die Fertigstellung der Dissertation leider nicht mehr miterleben konnte.

## 13. Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Ricardo Happeck  
Geburtsdatum: 01. Januar 1981  
Geburtsort: 17291 Prenzlau (Brandenburg)  
aktuelle Anschrift: Waldmeisterstraße 19, 06120 Halle (Saale)

### Ausbildung & Beruflicher Werdegang

1987 - 1989            Grundschule Penkun, 17328 Penkun

1989 - 1993            Julian-Marchlewski-Oberschule, 17328 Penkun

1993 - 1999            Deutsch-Polnisches Gymnasium, 17321 Löcknitz

10.07.1999            Abschluss, Allgemeine Hochschulreife

2000 - 2001            Zivildienst

2001 - 2004            IHK-Ausbildung zum Biologielaboranten  
Forschungszentrum für Medizin und Biowissenschaften, Borstel

2004 - 2009            Studium der Biologie  
Freie Universität Berlin

2009                    Diplomarbeit  
Freie Universität Berlin  
Institut für Biologie / Angewandte Genetik, Berlin-Dahlem  
AG Prof. Dr. Thomas Schmülling, Prof. Dr. Wolfgang Schuster

17.11.2009            Abschluss, Diplom

2010 - 2016            Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
IAEW / Pflanzenernährung  
AG Prof. Dr. Edgar Peiter

2016 - 2017            Technischer Assistent  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
IAEW / Ertragsphysiologie der Kulturpflanzen  
AG Prof. Dr. Marcel Quint

2017                    Weiterbildung im Bereich "Life Science Management"  
ATV GmbH, Leipzig